

Aus dem
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

der Klinik für Herzchirurgie
Herzzentrum Leipzig – Universitätsklinik
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Leonurus cardiaca:
Untersuchungen zur Wirksamkeit eines pflanzlichen
Antiarrhythmikums am isolierten Kaninchenherzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Kerstin Melichar
aus Cuxhaven

Leipzig 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Stefan Dhein
Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig
Direktor: Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Mohr
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Gutachter: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Stefan Dhein
Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig
Direktor: Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Mohr
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Hans Wilhelm Rauwald
Institut für Pharmazie
Fachbereich Pharmazeutische Biologie
Direktorin: Prof. Dr. Karen Nieber
Universität Leipzig

Prof. Dr. Manfred Kietzmann
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 09. Oktober 2007

Meiner Familie

Immer eine Handbreit Wasser unter dem Kiel...

INHALTSVERZEICHNIS

	ABKÜRZUNGEN	VI
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
	TABELLENVERZEICHNIS	XIII
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Leonurus cardiaca/Herzgespannkraut	2
2.1.1	Leonurus cardiaca	2
2.1.2	Indikation, Dosierung und Geschichtlicher Hintergrund	3
2.1.3	Klinische Studien	4
2.2	Herzrhythmusstörungen	5
2.2.1	Herzrhythmusstörungen im Überblick	5
2.2.1.1	Lokalisation von Herzrhythmusstörungen	6
2.2.1.2	Herzfrequenz von Rhythmusstörungen	6
2.2.1.3	Entstehungsmechanismus von Rhythmusstörungen	6
2.2.1.3.1	Normale und abnormale Reizinduktion	6
2.2.1.3.2	Abnormale Reizweiterleitung	7
2.3	Vorkommen von Arrhythmien durch Herzerkrankungen	8
2.3.1	Herzrhythmusstörungen beim Menschen	8
2.3.2	Herzrhythmusstörungen bei der Katze	9
2.3.3	Herzrhythmusstörungen beim Hund	9
2.3.4	Herzrhythmusstörungen beim Schwein	10
2.3.5	Proarrhythmisches Risiko der Antiarrhythmika	11
2.4	Kardiologische Untersuchungsmethoden	13
2.4.1	Historie der Langendorff-Apparatur	13
2.4.2	Arrhythmie Modelle zur Untersuchung antiarrhythmischer Wirkungen	15
2.4.2.1	Isoprenalin	15
2.4.2.2	Aconitum napellus (blauer Eisenhut)	17
2.4.2.3	Elektrische Stimulation	20
2.4.2.4	Referenzsubstanzen für die elektrische Stimulation	21
2.4.2.4.1	Ajmalin	21
2.4.2.4.2	Palmitoleinsäure	21
2.5	Kardiologische Untersuchungen beim Kaninchen	22

2.5.1	EKG	22
2.5.2	Herzultraschall	23
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Versuchstiere	24
3.2	Chemikalien und Pflanzenmaterial	24
3.2.1	Tyrode-Lösung	25
3.2.2	St. Thomas Lösung	25
3.3	Pharmaka	25
3.4	Geräte	25
3.5	Extraktion von Leonurus cardiaca- Kräuterdrogen	27
3.5.1	Ethanol-Wasser-Extrakt	27
3.5.2	Alkalischer Chloroform-Extrakt	29
3.5.3	Soxhlet-Extraktion	29
3.6	Fraktionierung des Soxhlet-Extraktes	30
3.6.1	Ausschüttlung	30
3.6.2	Präzipitation	31
3.6.3	Reduktion des Kaliumgehalts	32
3.6.4	Prozentuale Anteile der Soxhlet-Fractionen am Ausgangsextrakt	32
3.7	Dünnschichtchromatographie	33
3.8	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	35
3.9	Versuche am isolierten Herzen	36
3.9.1	Vorarbeit	36
3.9.1.1	Versuchsvorbereitung	36
3.9.1.2	Versuchstiovorbereitung, -präparation	37
3.9.1.3	Berechnung der einzusetzenden Extraktmenge	37
3.9.2	Versuchsdurchführung	39
3.9.2.1	Messprinzip	39
3.9.2.2	Langendorff-Apparatur	39
3.9.2.3	Versuchsprotokoll	40
3.9.2.4	Versuchsprotokoll der Arrhythmie Modelle	41
3.9.2.5	Datenerfassung	43
3.9.3	Datenanalyse, -auswertung	44
3.9.3.1	Elektrophysiologische Parameter	44
3.9.3.2	Funktionelle Parameter	47
3.9.4	In-vivo -Versuche	47

Inhaltsverzeichnis

3.9.4.1	Versuchstiovorbereitung	47
3.9.4.2	Versuchsablauf	48
3.9.4.3	Datenerfassung	48
3.9.5	Statistik	49
3.9.5.1	Versuchsserien	49
3.9.5.2	Signifikanz	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	In-vitro -Versuche - Extraktwirkungen auf das isolierte Herz	50
4.1.1	Kontrollwerte der funktionellen und elektrophysiologischen Parameter	50
4.1.2	Wirksamkeit des Ethanol/Wasser-Extrakts	51
4.1.3	Wirksamkeit des alkalischen Chloroform-Extrakts	51
4.1.4	Wirksamkeit des Soxhlet-Extrakts	52
4.1.5	Wirkung des Soxhlet - Extrakts unter „Low-Ca ²⁺ “ – Tyrode	54
4.1.6	Wirkungen der Ausschüttungen des Soxhlet – Extrakts	54
4.1.6.1	Wirkungen der Ethylazetatfraktion	54
4.1.6.2	Wirkungen der wässrigen Fraktion	55
4.1.7	Präzipitation der wässrigen Fraktion mit Methanol	57
4.1.7.1	Wirkungen des Präzipitats	57
4.1.7.2	Wirkung der Methanol-löslichen Fraktion	58
4.2	In-vitro -Versuche –Wirkungen des Extraktes im Arrhythmiemodell	61
4.2.1	Elektrische Stimulation	61
4.2.1.1	Wirkungen der Methanol-löslichen Fraktion	61
4.2.1.2	Referenzsubstanzen	64
4.2.1.3	Vergleich der Methanol-löslichen Fraktion mit den Referenzsubstanzen	66
4.2.2	β-mimetische Tachykardie	67
4.2.3	Monomorphe ventrikuläre Tachykardie	69
4.3	In-vivo -Versuche –Extraktwirkungen am narkotisierten Kaninchen	71
4.3.1	Herzultraschall	72
4.3.2	Auswirkungen der Methanol-löslichen Fraktion	72
4.3.3	Auswirkungen der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion	73
4.4	Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion am isolierten Herzen	75
4.5	Dokumentation / Darstellung der Soxhlet-Fractionen	77
4.5.1	Dünnschichtchromatographie	77
4.5.2	Hochleistungs-Flüssigchromatographie	78

5	DISKUSSION	80
5.1	Aspekte der Extraktion	80
5.2	Bedeutung einzelner Parameter des epikardialen Mapping für die Arrhythmogenese	81
5.3	Extrakteffekte am isolierten Kaninchenherz	83
5.3.1	Ausgangsextrakte unterschiedlicher Polarität	83
5.3.1.1	Wirksamkeit des alkalischen Chloroform-Extrakts	83
5.3.1.2	Wirksamkeit des Ethanol-Wasser-Extrakts	84
5.3.1.3	Wirksamkeit des Soxhlet-Extrakts	84
5.3.2	Ausschüttlung des wässrigen Soxhlet-Extrakts	85
5.3.2.1	Wirksamkeit der Ethylazetatfraktion	86
5.3.2.2	Wirksamkeit der wässrigen Fraktion	86
5.3.3	Präzipitation der wässrigen Fraktion	87
5.3.3.1	Präzipitat im Vergleich zur Methanol-löslichen Fraktion	87
5.3.4	Wirksamkeit der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion	89
5.4	Arrhythmie Modelle	91
5.4.1	Prophylaktischer Ansatz	91
5.4.2	Therapeutischer Ansatz	92
5.4.2.1	Isoprenalin	92
5.4.2.2	Aconitin-bedingte monomorphe ventrikuläre Tachykardie	93
5.5	In-vivo -Versuche	93
5.5.1	Beeinflussung des Blutdrucks und der Herzmechanik unter Leonurus cardiaca	94
5.5.2	Zentralnervöse Auswirkungen von Leonurus cardiaca	94
5.6	HPLC und DC	95
5.7	Schlussfolgerung	95
5.8	Indikation	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	99
7	SUMMARY	101
8	LITERATURVERZEICHNIS	103
8.1	Internet-Literaturverzeichnis	116

Inhaltsverzeichnis

9	ANHÄNGE	118
9.1	Anhang 1	118
9.2	Anhang 2	121
9.3	Anhang 3	132
9.4	Anhang 4	134
9.5	Anhang 5	136
9.6	Anhang 6	138
10	DANKSAGUNG	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACT	Aktivierungszeiten
ADP	Adenosindiphosphat
AgCl	Silberchlorid
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARI	Activation Recovery Intervall – lokale Potentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AU	Absorptionseinheit
AV	Atrioventrikulär
BCL	Basic Cycle Length – basale Zykluslänge
bpm	beats per minute
BTP	Break-through-Point - Erregungsursprungspunkt
β	beta
C	Konzentration des Stoffes
Ca^{2+}	Kalzium
CaCl_2	Kalziumchlorid
CAMIAT	Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAST	Cardiac Arrhythmia Suppression Trial
CF	Koronarfluss
Cl^-	Chlorid
CO_2	Kohlendioxid
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DFD	dark, firm and dry – dunkel, hart und trocken
DMSO	Dimethylsulfoxid
dU/dt min	Spannungsabfall/Zeit
EC_{50}	Effektive Konzentration, die bei 50% eine Wirkung auslöst
EEG	Elektroenzephalographie
EKG	Elektrokardiogramm
EMIAT	European Myocardial Infarction Amiodarone Trial
FS	Verkürzungsfraction
g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

GDP	Guanosindiphosphat
Gs-Protein	stimulierendes G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HCO_3^-	Bicarbonat
HF	Herzfrequenz
H_2O	Wasser
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
H_2PO_4^-	Phosphorige Säure
HW	Herzgewicht
Hz	Hertz
IE/kg	Internationale Einheit/kg
I_r -Kanal	Inward rectifier Kanal
IVSED	Interventrikuläre Septumdicke während der Diastole
IVSES	Interventrikuläre Septumdicke während der Systole
K^+	Kalium
K'	scheinbarer Verteilungskoeffizient
KCl	Kaliumchlorid
$\text{k}\Omega$	Kiloohm
I	Gefäßlänge
L	Lambda - Wellenlänge
L-Typ Kalziumkanal	longitudinaler Kalziumkanal
LVEDD	linksventrikulärer Diameter während der Diastole
LVESD	linksventrikulärer Diameter während der Systole
LVP	linksventrikulärer Druck
LWED	linksventrikuläre Hinterwand während der Diastole
LWES	linksventrikuläre Hinterwand während der Systole
mA	Milliampère
mbar	Millibar
MgCl_2	Magnesiumchlorid
Mg^{2+}	Magnesium
mg/kg	Milligramm/Kilogramm
MHS	Maligne Hyperthermie Syndrom
min	Minute
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilber
ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

mV	Millivolt
MVT	monomorphe ventrikuläre Tachykardie
MW	Mittelwert
μmol	Micromol
Na^{2+}	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
nmol	Nanomol
NP	Normalphasenchromatographie
NaSO_4	Natriumsulfat
η	Viskosität der Tyrodelösung
O_2	Sauerstoff
P	Perfusionsdruck
P (x, t)	epikardiales Potential am Ort x zum Zeitpunkt t
P_0 (x)	isoelektrisches Potential am Ort x
pH-Wert	negativ dekadische Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration (potentia Hydrogenii)
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PSE	pale, soft and exsudative – blass, weich und wässrig
PSS	Porcines Stress Syndrom
PTP	Leitungsgeschwindigkeiten
PVC	Polyvinylchlorid
QTc	Frequenz-unabhängige Aktionspotentialverlängerung
R	Widerstand
r	Radius des Gefäßes
rCF	relativer Koronarfluss
R_f	Retentionsfaktor
RP	Reversed phase Chromatographie
s	Sekunde
SEM	Standartfehler
SERCA	Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
TAT	Total Activation Time – Gesamtaktivierungszeit
t [min]	Zeit
Tn I	Troponin I
T-Typ Kalziumkanal	Transversaler Kalziumkanal

Abkürzungsverzeichnis

U/min	Umdrehungen/Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V _L	longitudinale Leitungsgeschwindigkeit
V _T	transversale Leitungsgeschwindigkeit
VEC	Vector - Erregungsausbreitung
VEL	Velocity - Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit
Y	1-256 Elektroden
Φ	Koronarfluß

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Leonurus cardiaca
- Abb. 2: Signaltransduktion der β -adrenergen Rezeptoren
- Abb. 3: Kalzium-Wirkung auf Tropomyosin
- Abb. 4: Extraktion und Fraktionierungen aus Leonurus cardiaca
- Abb. 5: Molekülinteraktion
- Abb. 6: Modifizierte Langendorff-Apparatur
- Abb. 7: Darstellung des Versuchprotokolls
- Abb. 8: Darstellung des Aconitin-Arrhythmiemodells
- Abb. 9: Darstellung des Arrhythmiemodells mit elektrischer Stimulation
- Abb. 10: Darstellung des Arrhythmiemodells mit Isoprenalin
- Abb. 11: Vektorerstellung der Erregungsausbreitung
- Abb. 12: Funktionelle Parameter unter dem Ethanol/Wasser-Extrakt
- Abb. 13: Funktionelle Parameter unter dem Chloroform-Extrakt
- Abb. 14: Funktionelle Parameter unter dem Soxhlet-Extrakt
- Abb. 15: Auswirkung unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen
in der Tyrode-Lösung auf den Soxhlet-Extrakt
- Abb. 16: Funktionelle Parameter unter der Ethylazetatfraktion
- Abb. 17: Funktionelle Parameter unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 18: Gesamtaktivierungszeit unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 19: Funktionelle Parameter unter dem Methanolpräzipitat
- Abb. 20: Darstellung der Kontraktionskraft unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 21: Funktionelle Parameter unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 22: Gesamtaktivierungszeit (TAT) unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 23: ARI und Dispersion von ARI unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 24: Reizschwellenverschiebung unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 25: Isochronmuster unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 26: Transversale/longitudinale Leitungsgeschwindigkeit
unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 27: Reizschwellenveränderung unter Ajmalin und Palmitoleinsäure
- Abb. 28: Isochronmuster unter Ajmalin
- Abb. 29: Isochronmuster unter Palmitoleinsäure
- Abb. 30: Longitudinale/transversale Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit
unter dem Methanol-Extrakt, unter Ajmalin und unter Palmitoleinsäure
- Abb. 31: Vergleich der kardialen Reizschwellenerhöhung
- Abb. 32: Kontraktionskraft (LVP) unter Isoprenalin und

- Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion
- Abb. 33: Epikardiales Potential unter Aconitin und
Aconitin mit Methanol-löslicher Fraktion
- Abb. 34: Peak-to-Peak Amplitude (PTP) unter Aconitin und
Methanol-löslicher Fraktion.
- Abb. 35: EEG, EKG und Blutdruck unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 36: EEG, EKG und Blutdruck unter der Kalium-reduzierten
Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 37: Kontraktionskraft unter der Kalium-reduzierten Fraktion
und der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 38: Wellenlänge unter der Methanol-löslichen Fraktion
und der Kalium-reduzierten Fraktion
- Abb. 39: Dünnschichtchromatogramm des Soxhlet-Extrakts
- Abb. 40: Trennung von Wirkprinzipien

ANHANG 2

- Abb. 1: PQ-Zeit und ST-Hebung unter dem Chloroform-Extrakt
- Abb. 2: ARI und Dispersion von ARI unter dem Chloroform-Extrakt
- Abb. 3: ST-Hebung unter dem Soxhlet-Extrakt
- Abb. 4: TAT, ARI und Dispersion von ARI und QTc unter dem Soxhlet-Extrakt
- Abb. 5: ST- Zeit unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 6: PQ-Zeit und QRS-Komplex unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 7: ARI und Dispersion von ARI unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 8: QTc-Veränderung unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 9: Epikardiale Geschwindigkeit (VEL) unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 10: Epikardiale Geschwindigkeit (VEL) der Herzareale unter der wässrigen
Fraktion
- Abb. 11: VEC und BTP unter der wässrigen Fraktion
- Abb. 12: PQ-Zeit, ST-Hebung und QRS-Komplex unter dem Präzipitat
- Abb. 13: Gesamtaktivierungszeit (TAT) unter dem Präzipitat
- Abb. 14: Epikardiale Geschwindigkeit (VEL) unter dem Präzipitat
- Abb. 15: PQ-Zeit und ST-Hebung unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 16: Wirkung der Methanol-löslichen Fraktion auf die Herzareale
- Abb. 17: VEC und BTP unter der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 18: Epikardiale Geschwindigkeit (VEL) unter der Methanol-löslichen
Fraktion
- Abb. 19: Reizschwellerhöhung unter Ajmalin und Palmitoleinsäure

ANHANG 3

- Abb. 1: BCL unter Isoprenalin und Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion
- Abb. 2: TAT unter Isoprenalin und Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion
- Abb. 3: ARI unter Isoprenalin und Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion
- Abb.4: Dispersion von ARI unter Isoprenalin sowie Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion

ANHANG 4

- Abb.1: BCL unter Aconitin und der Methanol-löslichen Fraktion
- Abb. 2: TAT unter Aconitin und der Methanol-löslichen Fraktion

ANHANG 5

- Abb. 1: TAT unter der Methanol-löslichen Fraktion und der Kalium-reduzierten Fraktion
- Abb.2: ARI unter der Methanol-löslichen Fraktion und der Kalium-reduzierten Fraktion
- Abb. 3: QTc unter der Methanol-löslichen Fraktion und der Kalium-reduzierten Fraktion
- Abb. 4: Dispersionsabfall unter der Methanol-löslichen Fraktion und der Kalium-reduzierten Fraktion

ANHANG 6

- Abb. 1: DC-Nachweis von Sacchariden
- Abb. 2: HPLC-Fingerprint
- Abb. 3: 3D-Darstellung des HPLC-Fingerprints

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Inhaltsstoffe von Leonurus cardiaca
Tab. 2 :	Nach Vaughan-Williams klassifizierte Antiarrhythmika
Tab. 3:	Natrium-Kanalkonformation
Tab. 4:	Referenzwerte der Elektrokardiographie beim Kaninchen
Tab. 5:	Referenzwerte der Echokardiographie beim Kaninchen
Tab. 6:	Zeitliche Darstellung der Gradientenelution
Tab. 7:	Lösungsverhältnis der Extrakte bzw. Fraktionen
Tab. 8:	In Gleichung (5) einzusetzende Endkonzentrationen
Tab. 9:	Kardiale Funktionalität unter Kontrollbedingungen

1 **EINLEITUNG**

In den letzten Jahrtausenden spielten Heilkräuter eine wichtige Rolle in der Medizin. Die volkstümlich unter dem Namen Herzgespannkraut bekannte Pflanze gehörte zu den Heilkräutern, die vielfach eingesetzt wurden. Die Anwendung des Herzgespannkrauts, lateinisch *Leonurus cardiaca*, wurde schon 1485 im ersten deutschsprachigen Kräuterbuch, dem *Hortus sanitatis*, bei Herzkrämpfen und Engbrüstigkeit empfohlen (MADAUS 1938). Im 19. Jahrhundert in Vergessenheit geraten, wurde in den 30iger Jahren des 20. Jahrhunderts das Interesse an Heilkräutern und auch an *Leonurus cardiaca* neu entfaltet (REUTER u. DHIEL 1969). *Leonurus cardiaca* wird ohne gesicherte wissenschaftliche Untersuchungen u.a. bei nervösen Herzbeschwerden, beim sog. Altersherz, eingesetzt (DAB-KOMMENTAR 1999). Studien an einzelnen Organen, Tieren und Menschen zeigten unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse.

Es ist unklar, bei welcher Form der Herzerkrankung *Leonurus cardiaca* konkret eingesetzt wurde und werden konnte. Krankheiten des Herzens bedingen häufig Arrhythmien, die durch Störungen in der Erregungsleitung und –bildung entstehen (VERTER u. DIETZ 1999). Arrhythmien werden anhand der Lokalisation, der dadurch verursachten Herzfrequenz und unterschiedlicher Entstehungsmechanismen eingeteilt (PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH 1998 a). Um Substanzen zu untersuchen, deren kardiologischer Wirkmechanismus unbekannt ist, kann man verschiedene Methoden einsetzen. Neben EKG und Herzultraschall ist die Langendorff-Apparatur eine kardiologische Untersuchungsmethode, mit der man die Vitalität isolierter Herzen über Stunden aufrecht halten und dabei Erregungsausbreitungsmuster und –geschwindigkeiten über ein Multi-Elektroden-Array bestimmen kann (DHEIN 1992). Zusätzlich ist es möglich, die Wirksamkeit der unbekannten Substanz mit bekannten Arrhythmie-Modellen zu vergleichen und so einen Eindruck des Wirkmechanismus zu bekommen. Der Einsatz herkömmlicher Antiarrhythmika ist mit einem nicht unbedeutenden Risiko verbunden. Alle gängigen Substanzen besitzen ein proarrhythmisches Risiko, das zu Kammerflimmern und plötzlichem Herztod führen kann (CAST INVESTIGATORS 1989). Durch das z.T. hohe proarrhythmische Potential der bei Herzrhythmusstörungen eingesetzten Antiarrhythmika, eröffnet der Einsatz pharmakologisch wirksamer Pflanzen, wie z. B. *Leonurus cardiaca*, neue Behandlungsperspektiven. Ob das Herzgespannkraut kardiale Wirkungen besitzt und antiarrhythmische Effekte am isolierten Herzen feststellbar sind, soll mit der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu werden verschiedene Extrakte aus *Leonurus cardiaca* hergestellt. Zusätzlich soll durch Fraktionierung der Extrakte versucht werden, wirksame Komponenten anzureichern und ein Wirkprinzip abzuleiten. Ob sich stoffliche Unterschiede zwischen den Extrakten herauskristallisieren, soll mittels HPLC und DC untersucht werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Leonurus cardiaca / Herzgespannkraut

Im Folgenden wird eine Pflanze beschrieben, die seit Jahrhunderten in der Volksmedizin gegen Herzbeschwerden eingesetzt wurde und eine phytotherapeutische Alternative zur Therapie von Arrhythmien bei Mensch und Tier, inklusive Lebensmittel liefernden Tieren, sein kann.

2.1.1 Leonurus cardiaca

Die aus der Familie der Lamiaceen (Lippenblütler) stammende Pflanze *Leonurus cardiaca* ist volkstümlich v.a. unter dem Namen Herzgespannkraut bekannt. Aber auch die Synonyme Löwenschwanz, Bärenschweif, Herzheil oder Herzkräutl werden verwendet (REUTER u. DHIEL 1969). Ursprünglich in West-, Mittel- und Ostasien beheimatet, hat sich das Herzgespannkraut heute in fast allen Ländern Europas und Nordamerika eingebürgert. In Deutschland ist vorrangig die Art *Leonurus cardiaca* var. *vulgaris* verbreitet (SCHULZ u. HAACK 1973). Charakteristisch für die bis zu 1,5 m hoch werdende Schutt- und Geröllpflanze sind ein viereckiger Stängel und purpurne bis blassrote Lippenblüten (MADAUS 1938; PAHLOW 1993; DAB-KOMMENTAR 1999). Abb. 1 zeigt *Leonurus cardiaca*. Auffällig bei den Lamiaceen ist ein hoher Kaliumgehalt, der bei *Leonurus cardiaca* mit 0,2 % in der Frischpflanze bestimmt wurde (BALANSARD 1936; ERSPAMER 1948; HEGNAUER 1966; KOZLOVA 1967).



Abb. 1 : *Leonurus cardiaca* Gesamtübersicht (linke Abbildung) und Blüten (rechte Abbildung)

Die bislang bekannten Inhaltsstoffe sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tab. 1: Aufgelistete Inhaltsstoffe von *Leonurus cardiaca* (DAB 2001); Stoffgruppe Triterpene aus (WICHTL 2002) hinzugefügt.

Stoffgruppe	Inhaltsstoffe
Diterpene	Leocardin 0,003 %
Iridoide	Ajugosid (Leonurid), Ajugol, Galiridosid, Reptosid
Flavonoidglykoside	Rutin, Quercitrin, Isoquercitrin, Hyperosid
Flavone	Genkwanin
Betaine	Stachydrin
Kaffeesäurederivate	Kaffeesäure-4-O-rutinosid 0,1 %
Gerbstoffe	5-9 %
Ätherisches Öl	Spuren
Syringasäureester	Leonurin
Triterpene	Ursolsäure, Oleanolsäure

2.1.2 Indikation, Dosierung und Geschichtlicher Hintergrund

Der Name *Leonurus* entstammt auf Grund seiner frappierenden Ähnlichkeit mit einem Löwenschwanz den griechischen Wörtern `Leon = Löwe` und `Oura = Schwanz` (MADAUS 1938). *Cardiaca* bezieht sich auf die Heilwirkung der Pflanze am Herzen (SAUERHOFF 2003). Laut DAB-KOMMENTAR 1999 wird "das Herzgespannkraut in der Volksmedizin ohne bisher gesicherte Untersuchungen bei nervösen Herzbeschwerden, beim sog. Altersherz, bei Asthma bronchiale, bei menstruellen oder klimakterischen Beschwerden auf Grund seiner ihm nachgesagten spasmolytischen, sedierenden, blutdrucksenkenden oder uterus-kontrahierenden Wirkungen eingesetzt". Die Tagesdosis beträgt 4,5 g Droge als Tee (DAB-KOMMENTAR 1999). Damit gehört *Leonurus cardiaca* zu den Problemstoffen, bei denen die wirksamen Inhaltsstoffe unbekannt sind und die Indikation des Einsatzes aus der Volksmedizin überliefert wurde (NAHRSTEDT 1985).

In Europa wurde das Herzgespannkraut zuerst zur Behandlung von Krämpfen bei Kühen eingesetzt (ROGERS 2000). Aber schon das erste in deutscher Sprache 1485 erschienene Kräuterbuch *Hortus sanitatis* (Garten der Gesundheit) empfiehlt das Herzgespann-Cordiatia gegen Magendrücken, Herzkrämpfe, bei Engbrüstigkeit und lahmen Gliedern (MADAUS 1938). Kräuterbücher als Pflanzen- und Drogenkundige Kompendien beschreiben detailliert Pflanzen und ihre medizinischen Anwendungsgebiete. Sie waren in erster Linie Fachbücher für Ärzte und Apotheker, wurden jedoch auch dem „gemeinen Mann“ näher gebracht (MEYER'S GROSSES TASCHENLEXIKON 1987). Theophrastus Bombastus von Hohenheim, unter dem Namen Paracelsus bekannt, beschrieb *Leonurus cardiaca*:

„Herzgespan / oder Herzgesperr / ist also genannt / dieweil es zum zittern des herzen / und dem bresten / so mann herzgespan an den Kindern nennet / dienlich gebraucht wirt“ (ANON. 2005 c). FUCHS (1543), LONICERUS (1564) und MATTHIOLUS (1565) greifen die im Hortus sanitatis beschriebenen Wirkungen auf und fügen noch die Anwendung bei Fallsucht hinzu. Culpepper beschrieb 1652 *Leonurus cardiaca* als “it is of use for trembling of the heart, and fainting and swooning. There is no better herb to drive away melancholy vapours from the heart, to strengthen it and make the mind cheerful” (ANON. 2005 b). Eine alte Legende über eine namentlich unbekannte Stadt, deren Wasserquelle durch ein Bett aus Herzgespannkraut fließt, besagt, dass die Menschen dort bis zu 130 Jahre lebten. Einer Person wurde nachgesagt, über 300 Jahre gelebt zu haben (ROGERS 2000).

Das Herzgespannkraut gehörte zu den Heilkräutern, die durch Jahrtausende eine große Rolle in der Medizin spielten. Heute wächst diese Pflanze als Unkraut an Wegrändern und unter Hecken, da sie im 19. Jahrhundert nahezu in Vergessenheit geriet (SAUERHOFF 2003). Erst in den 30iger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde das Interesse an der Pflanze neu entfacht (REUTER u. DHIEL 1969). In Anhang 1 wird die geschichtliche Dokumentation von *Leonurus cardiaca* aufgeführt.

2.1.3 Klinische Studien

Leonurus cardiaca ist eine vielseitig eingesetzte Pflanze, wenngleich ihre Wirksamkeit wissenschaftlich bislang nicht ausreichend bewiesen worden ist. SWEREW verabreichte 1931 einen Extrakt aus *Leonurus cardiaca* an Kaninchen. Toxische Wirkungen wurden nicht festgestellt, sondern vorrangig eine Vasodilatation der peripheren Gefäße des Kaninchenohrs und eine betäubende Wirkung auf das Nervensystem. Die zentralnervöse Wirkung erwies sich beim Frosch dreimal stärker als bekannte Baldrianpräparate (*Valeriana officinalis*) (MADAUS 1938). PEYER u. VOLLMER testeten 1935 in vivo an Kaninchen und Meerschweinchen die Herzwirksamkeit von *Leonurus cardiaca*. Sie konnten einen stopfenden Effekt, den sie auf den Gerbstoffgehalt der Pflanze zurückführten, sowie einen uteruskontrahierenden Effekt feststellen, jedoch keine Wirkungen am Herzen. Zusätzlich verwiesen sie auf eine stark diuretische und antiödematöse Wirkung des Extraktes. Wissenschaftliche Arbeiten, die seit 1930 in der ehemaligen UdSSR durchgeführt wurden, wiesen darauf hin, dass die Wirkung von *Leonurus cardiaca* auf periphere Blutgefäße und das zentrale Nervensystem begrenzt ist und kein Einfluss auf das isolierte Herz besteht (ROMANOWSKI 1959). PATER (1933) und POTLOG (1936) empfahlen die Anwendung von *Leonurus cardiaca* bei Epilepsie. BALANSARD entdeckte 1936 0,21 % Saponine und 0,17 % Glykoside (Bufadienolidische Glykoside) in *Leonurus cardiaca* und POLACCI führte 1948 die aktive Komponente in *Leonurus cardiaca* auf die Glykoside zurück (BALANSARD 1936; ORLANDI 1950; SCHULZ U. HAACK 1961; MADAUS 1987). ERSPAMER bestritt 1948 eine

herzorienteerte Wirkung von *Leonurus cardiaca* und führte vereinzelte Effekte am Herzen auf Kalium zurück, das in hohen Mengen in der Pflanze vorkommt. Anhand von Tierversuchen mit Kaninchen und Ratten konnte eine vasodilatatorische und sedative Wirkung festgestellt werden. Diese führte dosisabhängig bei intravenöser Injektion des Extraktes innerhalb von 48 Stunden post injectionem zum Koma und Tod des Tieres. Die Toxizität des wässrigen Extraktes war nur bei hohen Konzentrationen und Verabreichung als Injektion gegeben (ORLANDI 1950). An Kindern wurde eine Studie durchgeführt, die an Pavor nocturnus, Tachykardien, Erethismus und posttraumatischen Angstzuständen litten. Der Extrakt wurde oral verabreicht und die oben genannten Symptome konnten innerhalb von Tagen bis Wochen deutlich vermindert bis eliminiert werden. Weder Intoleranz noch Toxizität des Extraktes konnten beobachtet werden (ORLANDI 1950). ROMANOWSKI isolierte 1959 Stachydrine (Alkaloide) und stellte eine spasmische Wirkung auf den Uterus fest. Außerdem postulierte er weitere Untersuchungen, da in seinen Augen die herzunterstützende Wirkung des Herzgespannkrauts im Vergleich zu *Valeriana officinalis* (Baldrian) potenter ist. Erste medizinische Effekte am Herzen wurden durch Untersuchungen von WEISS (1988) beobachtet, der die Pflanze bei Tachykardie und Hyperthyreoidismus empfiehlt. Mittlerweile sind einige chemische Komponenten von *Leonurus cardiaca* bekannt. Ihre Relevanz für eine medizinische Anwendung ist noch nicht vollständig untersucht. MILKOWSKA-LEYCK et al. isolierten 2002 aus *Leonurus cardiaca* die Substanz Lavandulifoliosid und prüften die biologische Wirksamkeit im Tiermodell. Eine signifikante negative Chronotropie mit Verlängerung der PQ-, QT-Strecke und ein Blutdruckabfall sowie eine Verminderung des Koronarflusses wurden registriert. Der Gesamtextrakt, aus dem das Lavandulifoliosid isoliert wurde, zeigt zusätzlich eine Reduktion der spontanen lokomotorischen Aktivität. Somit konnte gezeigt werden, dass die pharmakologischen Wirkungen vom Lavandulifoliosid für die Gesamteffekte von *Leonurus cardiaca* nicht allein verantwortlich sind (MILKOWSKA-LEYCK et al. 2002) und diese Pflanze weiterer Forschung bedarf.

2.2 Herzhrythmusstörungen

Leonurus cardiaca wird seit Jahrhunderten bei Herzbeschwerden als Tee eingesetzt. Die Art der Herzbeschwerden, bei der die Pflanze angewendet wurde, ist unbekannt. Deshalb wird im Folgenden auf die Ursachen für Rhythmusstörungen des Herzens im Überblick eingegangen.

2.2.1 Herzhrythmusstörungen im Überblick

Herzhrythmusstörungen bezeichnen alle Veränderungen der elektrischen Herzaktion, die durch Arrhythmien und durch Abweichungen von der normalen Herzfrequenz gekennzeichnet sind. Rhythmusstörungen des Herzens stellen kein eigenständiges

Krankheitsbild dar, sondern resultieren aus Störungen in der Erregungsleitung und der Erregungsbildung. Als Ursachen für Arrhythmien sind akute und chronische Schädigungen des Herzmuskels zu nennen, die durch Sauerstoffmangel, entzündliche oder degenerative Muskelveränderungen oder durch die Einwirkung von Giften (endogen und exogen) entstehen können. Störungen des Elektrolythaushalts, Einwirkungen von Pharmaka (z.B. Digitalispräparate, Antiarrhythmika), Schilddrüsendysfunktionen sowie eine verminderte Energiebereitstellung auf zellulärer Ebene können ebenfalls zu Rhythmusstörungen des Herzens führen (VERTER u. DIETZ 1999). Klassifiziert werden Herzrhythmusstörungen anhand der Lokalisation, der Herzfrequenz und des Entstehungsmechanismus (PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH 1998 a).

2.2.1.1 Lokalisation von Herzrhythmusstörungen

Man unterscheidet in Abhängigkeit vom Ort supraventrikuläre Rhythmusstörungen (vom Vorhofmyokard ausgehend), atrioventrikuläre Rhythmusstörungen (Vorhof und Kammermyokard einbeziehend) und ventrikuläre Rhythmusstörungen (von den Kammern ausgehend) (DHEIN u. HINDRICKS 2004).

2.2.1.2 Herzfrequenz von Rhythmusstörungen

Im Hinblick auf die Herzfrequenz werden Rhythmusstörungen in tachykarde und bradykarde Formen unterteilt. Dabei treten Bradykardien als Folge einer Störung des Sinusknotens oder des Atrioventrikularknotens auf und sind durch eine Frequenz mit < 60 bpm charakterisiert. Tachykardien können sowohl supraventrikulären als auch ventrikulären Ursprungs sein und weisen eine Frequenz > 100 bpm auf (DHEIN u. HINDRICKS; HESS 2004).

2.2.1.3 Entstehungsmechanismus von Rhythmusstörungen

Die Pathogenese von Arrhythmien lassen sich in drei Kategorien einteilen, die im Folgenden erklärt werden.

2.2.1.3.1 Normale und abnormale Reizinduktion

Automatizität

Eine normale und abnormale Reizinduktion kann zu Rhythmusstörungen führen. Der Begriff Reizinduktion (Präpotential) beschreibt einen elektrischen Impuls, der in den Schrittmacherzellen zur Depolarisation und damit zum Ablauf und zur Weiterleitung des Aktionspotentials im ganzen Herzen führt. Anstoß für den elektrischen Impuls sind Veränderungen des Ionengradienten durch einen Na^{2+} -Ioneneinwärtsstrom (WIT 1990). Die Impulsrate der Schrittmacherzellen ist abhängig vom maximalen diastolischen Potential und dem Schwellenpotential und bestimmt damit die Automatizität der Herzfrequenz.

Erregungsbildungsstörungen im Sinusknoten werden als nomotop oder automatisch bezeichnet (WALDO u. WIT 1993). Dazu gehören u.a. Sinusbradykardien, -tachykardien, -arrhythmien und das Sick-Sinus-Syndrom (Tachykardie-Bradykardie-Syndrom). Normalerweise bildet nur der Sinusknoten Präpotentiale. Ist die Funktion von Sinus- und/oder AV-Knoten unterdrückt, so übernehmen latente (ektope) Schrittmacherzellen diese Aufgabe. Zellen, deren Automatizität sich außerhalb des Sinus- und des AV-Knotens manifestiert, werden als latente bzw. ektope Schrittmacherzellen bezeichnet (VASSALLE 1977; WIT 1990; WALDO u. WIT 1993; HESS 2004). Ektope Erregungsbildungsstörungen können zu Extrasystolen, Ersatzrhythmen, Tachykardien, Kammerflattern und -flimmern führen.

Getriggerte Aktivität

Nach einer physiologischen Reizinduktion kann es zum erneuten, pathologischen Reiz kommen, wenn durch Nachdepolarisation ein neues Aktionspotential entsteht. Dies wird auch als triggernde Aktivität bezeichnet, da ein vorangegangenes Aktionspotential zur Induktion erforderlich ist. Man unterscheidet frühe und späte Nachdepolarisationen, die bei Erreichen des Schwellenpotentials ein neues Aktionspotential bedingen. Die frühen Nachdepolarisationen kommen während der Repolarisationsphase eines Aktionspotentials vor. Sie entwickeln sich überwiegend bei verlangsamer Herzfrequenz, da dann die Plateauphase des Aktionspotentials länger andauert. Die späten Nachdepolarisationen entstehen am Ende der Repolarisationsphase. Im Rahmen einer Ca^{2+} -Überladung kommt es zu einer erhöhten Herzfrequenz und dadurch zur Verkürzung der Zykluslänge des Aktionspotentials. Dies kann zur Entstehung von späten Nachdepolarisationen führen (WIT 1990; WALDO u. WIT 1993).

2.2.1.3.2 Abnormale Reizweiterleitung

Eine abnormale Reizweiterleitung kann durch einen Leitungsblock oder einen unidirektionalen Block bedingt sein und zu Reentry-Arrhythmien führen. Ein Leitungsblock zeichnet sich durch die Weiterleitung eines Impulses in Herzregionen aus, die nicht erregbar sind. Der unidirektionale Block charakterisiert sich durch die Reizleitung in nur eine Richtung und kann durch regionale Unterschiede in der Erregbarkeit und Anisotropie der Herzmuskelfasern begründet sein (WIT 1990). Reentry-Arrhythmien entstehen durch eine inhomogene Erregbarkeit, die zu einem unidirektionalen Block führt und dadurch eine kreisende Impulsweiterleitung ermöglicht. Voraussetzung dafür ist, dass die Wellenlänge des Impulses gleich groß oder kürzer als die Länge der Erregungsbahn ist (WALDO u. WIT 1993; DHEIN u. HINDRICKS 2004).

Simultane Impulsinduktion und –weiterleitung kann in Form einer Pararrhythmie entstehen, die durch das Nebeneinanderbestehen von Kammerrhythmus und Sinusrhythmus gekennzeichnet ist.

2.3 Vorkommen von Arrhythmien durch Herzerkrankungen

Jede der oben beschriebenen Arrhythmien kann sowohl beim Menschen als auch bei Tieren im Rahmen von Herzerkrankungen und Traumata auftreten. Nicht selten entstehen lebensbedrohliche, therapiebedürftige Arrhythmien. Im Folgenden werden die häufigsten Arrhythmien und ihre potentiellen Auslöser, die bei Mensch, Katze, Hund und Schwein auftreten, erläutert, da unter Umständen Leonurus cardiaca bei einigen Arrhythmieformen therapeutisch erprobt werden könnte.

2.3.1 Herzrhythmusstörungen beim Menschen

In der westlichen Welt sind Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Todesursache (VESTER u. STRAUER 1997). Dabei kommt die koronare Herzkrankheit mit dem akuten Myokardinfarkt, die Phase des Postinfarkts mit ihren elektrophysiologischen Umbauprozessen sowie Störungen des Elektrolythaushalts verhältnismäßig am häufigsten vor (DHEIN u. HINDRICKS 2004). Die koronare Herzkrankheit verursacht ca. jeden 5. Todesfall. Die häufigste Ursache der koronaren Herzkrankheit ist die Arteriosklerose, bei der v.a. Plaque-artige Cholesterinablagerungen eine Stenosierung des Gefäßquerschnitts bedingen. Der Cholesterinplaque kann einreißen und zu einer Thrombenbildung führen, der den kompletten Verschluss des Gefäßes hervorrufen kann (HESS 2004). Die Folge ist eine myokardiale Minderperfusion mit Muskelzellnekrosen. Im Anschluss kommt es zu einer reaktiven Entzündungsreaktion mit Narbenbildung (syn. Myokardinfarkt), die zu Rhythmusstörungen führen können. Neben möglichen operativen Maßnahmen werden in der Postinfarktperiode Klasse III Antiarrhythmika eingesetzt (DHEIN u. HINDRICKS 2004), da diese die Aktionspotentialdauer verlängern und dadurch Arrhythmien vorbeugen. Daneben ist die Angina pectoris eine Bezeichnung für die Symptome einer akuten Koronarinsuffizienz und fällt ebenfalls unter die koronare Herzkrankheit. Klinisch unterscheidet man die stabile Angina pectoris (Schmerzen treten nur bei körperlicher Belastung auf) und die instabile Angina pectoris (neu auftretende und schon bei leichten Belastungen zunehmende Schmerzen). Die instabile Form ist als potenzielle Vorstufe eines Herzinfarkts anzusehen (PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH 1998 a). Therapiert wird die stabile Angina pectoris mit Nitroglycerin zur Vasodilatation der Koronararterien. Die instabile Form wird mit Nitroglycerin, Kalziumantagonisten und antithrombotischen Medikamenten behandelt. Kalzium-Antagonisten ermöglichen einen geringeren Verbrauch von Nitroglycerin, da sie

eine Vasodilatation erzeugen und durch ihre negativ inotrope Wirkung den Sauerstoffbedarf des Herzens mindern (HESS 2004).

2.3.2 Herzrhythmusstörungen bei der Katze

Kardiomyopathien sind die führenden Formen der feline Herzerkrankungen. Dabei wird die feline Kardiomyopathie in 1) eine dilatative, 2) eine hypertrophe, 3) eine restriktive und 4) in eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Form eingeteilt (KITTLESON 2005). Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die am häufigsten diagnostizierte Herzkrankung bei Katzen und soll deshalb in der hier vorliegenden Arbeit als einzige Form näher beschrieben werden. Kater entwickeln die HCM früher und zeigen eine schwerere klinische Symptomatik. Charakteristisch für eine hypertrophe Kardiomyopathie ist ein hypertropher, nicht dilatierter linker Ventrikel, dessen freie Wand und interventrikuläres Septum konzentrisch verdickt sind. Ist die Ausgangsursache, wie z.B. bei einer sarkomeren Genmutation, ein ausschließlich myokardiales Problem, so wird die HCM als primär bezeichnet. Liegen eine Aortenstenose, Bluthochdruck oder eine Schilddrüsenüberfunktion zu Grunde, so entsteht eine sekundäre Form der HCM (KITTLESON 2005). Am häufigsten wird die sekundäre HCM durch eine Hyperthyreose bedingt. Schilddrüsenhormone induzieren eine schnellere Aktin-Myosin-Interaktion, erhöhen die sarkolemmalen Ca^{2+} -Kanäle und steigern die Zunahme von kardialen β -Rezeptoren. Dies bewirkt zum einen eine Kontraktilitätssteigerung des Herzens, durch die die Herzmuskulatur letztlich hypertrophiert. Dies führt zur Steifigkeit des Myokards, durch die die Herzgefäße komprimiert werden. Eine Minderperfusion entsteht und durch die Ischämie bilden sich lokal Nekrosen. Die daraus resultierenden Myokardfibrosen vermindern die Elastizität des Herzens während der Diastole und bedingen damit einen reduzierten kardialen Out-put. (KITTLESON 2005). Zum anderen resultiert aus dem erhöhten Anteil von β -Rezeptoren eine gesteigerte Herzfrequenz, durch die Tachyarrhythmien entstehen können (PANCIERA 2000). Akut werden neben einer chirurgischen Thyreoidektomie die Sinustachyarrhythmien mit β -Blockern behandelt (PANCIERA 2000). Die chronische, rein palliative Therapie der fortgeschrittenen hypertrophen Kardiomyopathie setzt sich aus Furosemid, ACE-Hemmern, Ca^{2+} -Kanal-Blockern und β -Blockern zusammen (KITTLESON 2005).

2.3.3 Herzrhythmusstörungen beim Hund

Bei Hunden kommen Arrhythmien häufig im Rahmen von Traumata vor. Dazu gehört u.a. die Magendrehung des Hundes, die im Folgenden näher erklärt wird. Die Magendrehung (Torsio ventriculi) tritt bei großen und riesigen Hunderassen, wie z.B. Doggen, Schäferhunden und Dobermännern auf. Es handelt sich um eine dramatische Überdehnung des Magens mit Futterresten, Flüssigkeit und Luft und ist meist die Folge postprandialer, körperlicher

Bewegung. Dabei kann sich der Magen drehen und um seine Längsachse (Torsio) oder um seine Querachse verlagern (Volvulus) (SUTER 2001). Durch die Drehung kommt es zur Obstruktion des Pylorus und der Mageninhalt kann nicht in den Dünndarm gelangen. Zusätzliche Folge ist die Obstruktion der V. cava caudalis und ein reduzierter venöser Rückfluss zum Herzen, so dass der kardiale Out-put vermindert wird. Dies führt zur Reduktion des arteriellen Blutdrucks und damit zur Minderperfusion des Myokards und des Magen-Darm-Traktes (PANCIERA 2000). Resultat ist ein hypovolämischer Schock, der durch eine devitalisierte Magenwand, Milzdrehung und einen endotoxischen Schock verstärkt wird (KITTLESON 2005). Ca. 40 % aller Hunde mit Magendrehung entwickeln durch eine Hypovolämie und durch Störungen im Säure-Basen-Haushalt Herzrhythmusstörungen wie z.B. ventrikuläre Tachyarrhythmien und ventrikuläre Extrasystolen. Die Arrhythmien können sich bis zu 72 Stunden post operationem entwickeln, deren Entstehung auf die Hypovolämie, die Azidose und post operationem auf einen Reperfusionsschaden zurückzuführen sind (BOHN 2001). Die Therapie der Magendrehung ist immer eine chirurgische Lösung zur Dekompression des Magens und Entdrehung von Magen und Milz. Häufig reduzieren sich die Arrhythmien nach Korrektur von Säure-Basen-Haushalt und hämostatischen Störungen. Entstehen im Rahmen der Arrhythmien trotzdem Synkopen oder sind Tachykardien paroxysmal und polymorph mit > 150 Schläge/min, so wird Lidocain im Bolus oder als Dauerinfusion appliziert (PANCIERA 2000; KITTLESON 2005).

2.3.4 Herzrhythmusstörungen beim Schwein

Die Belastungsmyopathie des Schweins ist das Syndrom einer abnorm beschleunigten Glykolyse und Laktatbildung, das durch physische und psychische Stresssituationen ausgelöst wird (HIEGEMANN 2002). Besonders fleischreiche Schweinerassen, wie z.B. Pietrain, Belgische Landrassen und Hybriden dieser Rassen mit deutschen Landrassen, besitzen das MHS-Gen (maligne-Hyperthermie-Syndrom-Gen), welches eine Stressüberempfindlichkeit verursacht und eine Belastungsmyopathie begünstigt. Von den Veränderungen betroffen ist der Ryanodinrezeptor der Skelettmuskulatur, der Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freisetzt (DENBOROUGH 1998; MONNIER et al. 2000). Die dadurch ausgelösten verstärkten Muskelkontraktionen führen zu einem erhöhten Energieverbrauch (WENZEL 1977; WALDMANN u. WENDT 2001), aus dem sich eine Belastungsmyopathie entwickeln kann. Bei stressempfindlichen Schweinen kann eine starke, ungewohnte Belastung, wie sie beim Transport, vor der Schlachtung, dem Deckakt und der Geburt auftritt, zu einer Katecholamin-bedingten Tachykardie führen (HIEGEMANN 2002). Durch die erhöhte Herzfrequenz wird die Diastolendauer verkürzt und damit die Versorgung der Koronararterien vermindert. Da die physiologische, relative Diastolendauer beim Schwein mit unter 50 % des Herzzyklus niedrig ist, wird bei einer Tachykardie das Herz noch

weniger mit arteriellem Blut versorgt. Folge ist eine erhöhte Anfälligkeit des Schweins für plötzliches Herzversagen bei Stress. Der plötzliche Herztod des Schweins wird auch als akute Belastungsmyopathie, Transporttod, maligne Hyperthermie oder Porcines Stress Syndrom (PSS) bezeichnet. Innerhalb einer Stunde entwickelt sich durch Stress eine Insuffizienz des oxidativen Energiestoffwechsels, dessen Folge eine metabolische Azidose, Hyperthermie, Hyperkaliämie und der plötzliche Tod des Tieres ist. Überleben die Schweine die akute Belastungsmyopathie länger als zwei Stunden, so entsteht eine akute Rückenmuskelnekrose, die auch als Bananenkrankheit bezeichnet wird. Die häufigste Form der Belastungsmyopathie verläuft klinisch latent und äußert sich durch die postmortale Entstehung von PSE-Fleisch (pale, soft and exsudative) und DFD-Fleisch (dark, firm and dry).

In Deutschland werden jährlich ca. 40 Millionen Schweine zum Schlachthof transportiert, von denen ca. 0,5 % (ca. 200.000) am plötzlichen Herztod sterben (WALDMANN u. WENDT 2001). Zudem wird die Fleischqualität bei 5 - 6 % der geschlachteten Schweine beanstandet, was zusätzliche wirtschaftliche Einbußen in Millionenhöhe zur Folge hat (HIEGEMANN 2002). Bei Schlachtschweinen können Medikamente als Prophylaxe für den Transport oder im Rahmen der Therapie einer Belastungsmyopathie nur eingesetzt werden, wenn sie keine Wartezeiten aufweisen und für das Schwein zugelassen sind. Carazolol ist der einzige für das Schwein zugelassene β -Blocker, der Katecholamin-induzierte Tachykardien in Stresssituationen effektiv hemmt. Eine Anwendung bei Schlachttransporten ist zurzeit nicht möglich, da in Deutschland kein zugelassenes Präparat im Handel ist (VETIDATA 2005). Als wichtiges Therapeutikum bei der malignen Hyperthermie wird Dantrolen empfohlen. Dantrolen verschiebt die Reizschwelle für das Auslösen einer Kontraktion und vermindert die Kalzium-Freilassung. Dadurch wird die Kontraktionskraft des Skelettmuskels halbiert (BRADLEY et al. 1997; FANGYI ZHAO et al. 2001). Der exakte Wirkungsmechanismus von Dantrolen ist unbekannt. Dantrolen ist beim Lebensmittel liefernden Tier nicht zugelassen (VETIDATA 2005).

2.3.5 Proarrhythmisches Risiko der Antiarrhythmika

Die bedeutendste Limitierung im Einsatz von Antiarrhythmika auch beim Menschen ist ihre Eigenschaft, die Gesamtmortalität durch arrhythmogene und negativ inotrope Effekte zu erhöhen. Dieser proarrhythmische Charakter führte sogar zu einem frühzeitigen Abbruch klinischer Studien (CAST INVESTIGATORS 1989). Prinzipiell existieren zwei Hauptmechanismen, die zu einer Proarrhythmie führen: Verlängerung der Aktionspotentialdauer und des QT-Intervalls im EKG durch Klasse IA und III Antiarrhythmika, Folge sind Torsade-de-Pointes-Arrhythmien, sowie die Entstehung einer breiten QRS-Komplex-Tachykardie durch

Klasse IA, IB und IC, aus der ein Kammerflimmern resultieren kann (DI MARCO 2005). Vor diesem Hintergrund hat sich das Interesse auf Antiarrhythmika der Klasse III gerichtet. Studien wie EMIAT (European Myocardial Infarct Amiodarone Trial) und CAMIAT (Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial) untersuchten die Wirkung von prophylaktischer Amiodarongabe hinsichtlich des plötzlichen Herztodes. Es konnte gezeigt werden, dass unter Amiodaron die Häufigkeit des plötzlichen Herztodes gesenkt, die Gesamtmortalität jedoch nicht beeinflusst wurde (JUNG u. LÜDERITZ 2005). Im Rahmen von Mapping-Analysen konnte von DHEIN (1992) gezeigt werden, dass eine Änderung der epikardialen Erregungsgeometrie durch Antiarrhythmika verursacht wird und einer Arrhythmie vorausgeht. Das proarrhythmische Risiko der untersuchten Antiarrhythmika hinsichtlich ventrikulärer Arrhythmien konnte wie folgt eingestuft werden: Flecainid > Propafenon > Chinidin > Ajmalin > Procainamid > Verapamil, Mexiletin, Lidocain > Sotalol > Propranolol (DHEIN 1992; DHEIN et al. 1993). Tabelle 2 soll einen Überblick über die gängigen Antiarrhythmika und ihre Wirkprofile sowie Indikationen ermöglichen.

Tab. 2 : Übersicht über die nach Vaughan-Williams klassifizierten Antiarrhythmika (DHEIN 1992; MUTSCHLER 1996; WEIRICH u. WENZEL 2000; KATZ 2001; DI MARCO 2005; UNGEMACH 2006)

Klassifizierung	Ionenkanal	Wirkstoffe	Wirkprofil	Indikation
Klasse I			<u>Natriumkanalblockade</u>	
A	Na ⁺ ↓, K ⁺ ↓, Ca ²⁺ ↓	Chinidin, Ajmalin, Prajmalin, Procainamid, Disopyramid	Aktionspotentialdauer ↑ Erholungszeit Na-Kanäle ↔ Negativ inotrop Repolarisationszeit ↑	Vorhofflimmern/fluttern, supraventrikuläre und ventrikuläre Tachykardie, Extrasystolie, Reentryarrhythmien
B	Na ⁺ ↓, K ⁺ ↑	Lidocain, Tocainid, Mexiletin, Phenytoin	Aktionspotentialdauer ↓ Erholungszeit Na-Kanäle ↑ Repolarisationszeit ↓	Ventrikuläre Tachykardie, ventrikuläre Extrasystolie
C	Na ⁺ ↓	Flecainid, Propafenon	Aktionspotentialdauer ↔	Supraventrikuläre/ventrikuläre Tachykardie, ventrikuläre Extrasystolie

Klassifizierung	Ionenkanal	Wirkstoffe	Wirkprofil	Indikation
<u>Klasse II</u>	Ca ²⁺ ↓	Carazolol	<u>β-Adrenolytika</u> Negativ inotrop Negativ chronotrop	Sinustachykardie supraventrikuläre, paroxysmale Tachykardie, ventrikuläre Extrasystolie, frühe/späte Nachdepolarisationen
<u>Klasse III</u>	K ⁺ ↓	Sotalol, Amiodaron	<u>Kaliumkanalblockade</u> Repolarisationszeit ↑	Reentryarrhythmien mit kleiner erregbarer Lücke, ventrikuläre Extrasystolie, ventrikuläre Tachykardie
<u>Klasse IV</u>	Ca ²⁺ ↓	Verapamil, Diltiazem, Nifedipin	<u>Kalziumkanalantagonisten</u> Negativ chronotrop	Paroxysmale supraventrikuläre Tachykardien, abnorme Automatie

2.4 Kardiologische Untersuchungsmethoden

Mit der im folgendem erläuterten Langendorff-Apparatur wird die Wirkung von Leonurus-Extrakten untersucht.

2.4.1 Historie der Langendorff-Apparatur

Der 1853 in Breslau geborene Mediziner Oskar Langendorff entwickelte eine Methode, die erstmals die Untersuchung von isolierten, lebenden Herzen außerhalb des Körpers ermöglichte. Mit seinem 1895 veröffentlichten Werk „Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen“ prägte LANGENDORFF maßgeblich die Erkenntnisse des kranken und gesunden Herzens für die gegenwärtige Kardiologie. Es gibt zwei gängige Langendorff-Modelle, wobei das eine mit einem konstanten Perfusionsdruck und das andere mit einem konstanten Koronarfluss betrieben wird. Beide Modelle sind in Analogie zum Ohm'schen Gesetz, mit dem der Widerstand der Koronarzirkulation beschrieben werden kann, entstanden (DHEIN et al. 2005 b). Der Koronarfluss eines isolierten Herzens ist nur von zwei Größen abhängig:

1. dem Perfusionsdruck als antreibende Kraft
2. dem Widerstand als hemmende Kraft.

Der Koronarfluss wird theoretisch daher umso größer sein, je höher der Perfusionsdruck und je geringer der Widerstand im Herzen ist. Daher gilt:

$$R = P / \Phi \quad (1)$$

P = Perfusionsdruck

R = Widerstand

Φ = Koronarfluss

In Anlehnung an das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz ist der Radius eines Gefäßes ausschlaggebend für den Widerstand in einem Herzen, da eine Vasokonstriktion einen erhöhten und eine Vasodilatation einen verminderten Widerstand zur Folge hat.

$$R = 8 \eta l / \pi r^4 \quad (2)$$

η = Viskosität der Tyrodelösung

l = Gefäßlänge

r = Radius des Gefäßes

Ist nun der *Perfusionsdruck konstant*, so variiert die Höhe des Koronarflusses in Abhängigkeit vom Gefäßradius. Eine Vasodilatation geht folglich mit einer Erhöhung und eine Vasokonstriktion mit einer Abnahme des Koronarflusses einher. Um einen konstanten Druck zu schaffen, existieren zwei Wege. Ein ausreichender Perfusionsdruck kann durch den hydrostatischen Druck einer Lösung oder durch eine peristaltische Pumpe erzielt werden. Bei der ersten Methode stellt sich die Frage des richtigen Drucks, da ein zu hoher Druck zu einem intramuralen Ödem und ein zu niedriger Druck zu einer Hypoperfusion einhergehend mit Ischämie führt. Bei der letzten Methode ist der Apparaturnaufwand enorm. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Perfusionsdruck mit Hilfe des hydrostatischen Drucks erzeugt. Wenn der *Koronarfluss konstant* ist, so resultiert der Perfusionsdruck ebenfalls aus der Abhängigkeit des Gefäßradius, da eine Vasodilatation einen niedrigen Perfusionsdruck und eine Vasokonstriktion einen hohen Perfusionsdruck bedingt. Um den korrekten Koronarfluss verwenden zu können, muss folgende Gleichung in Betracht gezogen werden:

$$CF = 7,43 \times HW^{0,56} \quad (3)$$

CF = Koronarfluss

HW = Herzgewicht

(DÖRING u. DEHNERT 1988)

2.4.2 Arrhythmiemodelle zur Untersuchung antiarrhythmischer Wirkungen

Im Folgenden sollen detailliert die Wirkungsmechanismen der drei Arrhythmiemodelle und der Referenzsubstanzen vorgestellt werden, anhand derer die Wirkungsbreite der Methanol-löslichen Fraktion von *Leonurus cardiaca* eruiert und verglichen wurde:

2.4.2.1 Isoprenalin

Schon Leonhard Fuchs, einer der herausragenden deutschen Botaniker, beschrieb 1543: „Herzgespan ist fürtrefflich gut zu dem Klopfen des Herzens“ (FUCHS 1543). Bis heute wird *Leonurus cardiaca* bei nervösen Herzbeschwerden (WICHTL 2002) eingesetzt. Ob mit der Pflanze Tachykardien sympathomimetischen Ursprungs therapiert wurden oder ob dies eine allgemeine Bezeichnung für Krankheiten am Herzen war, bleibt in den Überlieferungen der Literatur unklar. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit mit Isoprenalin eine Sinustachykardie am isolierten Kaninchenherzen ausgelöst, um festzustellen, ob die Methanol-lösliche Fraktion eine β -blockierende Wirkung besitzt. Isoprenalin ist ein β -Sympathomimetikum, welches am Herzen eine positive Inotropie, Lusitropie und Chronotropie sowie eine Verbesserung der AV-Überleitungszeit (UNGEMACH 2006) bewirkt.

Alle Wirkungen am Herzen basieren auf der Aktivierung des β -Adrenorezeptor-G-Protein-Adenylatzyklase-Systems:

Isoprenalin bindet an der Zelloberfläche an den β -Rezeptor und verändert dessen Konformation. Dadurch wird ein G_s -Protein aktiviert, welches durch die Spaltung von GTP zu GDP die katalytische Aktivität der Adenylatzyklase stimuliert. Dieses Enzym konvertiert ATP in cAMP und aktiviert eine cAMP-abhängige Kinase, die Proteinkinase A. Dieser Prozess setzt die katalytische Untereinheit C der Proteinkinase frei, die wiederum die Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen katalysiert (s. Abb. 2). Ausschlaggebend für die positive Inotropie ist dabei die Phosphorylierung des L-Typ Kalziumkanals, da dadurch der Kanal verstärkt geöffnet wird. Die wichtigste Aufgabe der durch diesen Kanal eintretenden Kalzium-Ionen besteht in der Bindung an einen Kalzium-Rezeptor, der sich auf der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums befindet. Dadurch wird die Freisetzung einer größeren Menge an Kalzium-Ionen als üblich aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol induziert. Dieser Mechanismus wird auch als Kalzium-getriggerte Kalzium-Freisetzung bezeichnet (KATZ 2001). Das im Zytosol befindliche Kalzium steht nun für die Bindung an Troponin C zur Verfügung. Durch eine vermehrte Aktin-Myosin-Interaktion kommt es schließlich zu einer gesteigerten Kontraktilität (BARRY u. BRIDGES 1993; KATZ 2001; SAUCERMAN et al. 2003). Isoprenalin bedingt eine konzentrationsabhängige Kontraktilitätssteigerung von 100 auf maximal 200 %. Parallel steigt der kardiale Sauerstoffverbrauch von 100 auf 192 % an (SORENSEN u. NIELSEN-KUDSK 1986). Nach

Abschluss der Kontraktion wird das Kalzium über eine energieabhängige Ca^{2+} -ATPase wieder in das sarkoplasmatischen Retikulum aufgenommen. Ohne die Wirkung von Isoprenalin wird die Leistungsfähigkeit dieser ATPase durch das inhibitorische Protein Phospholamban eingeschränkt (GARVEY et al. 1988).

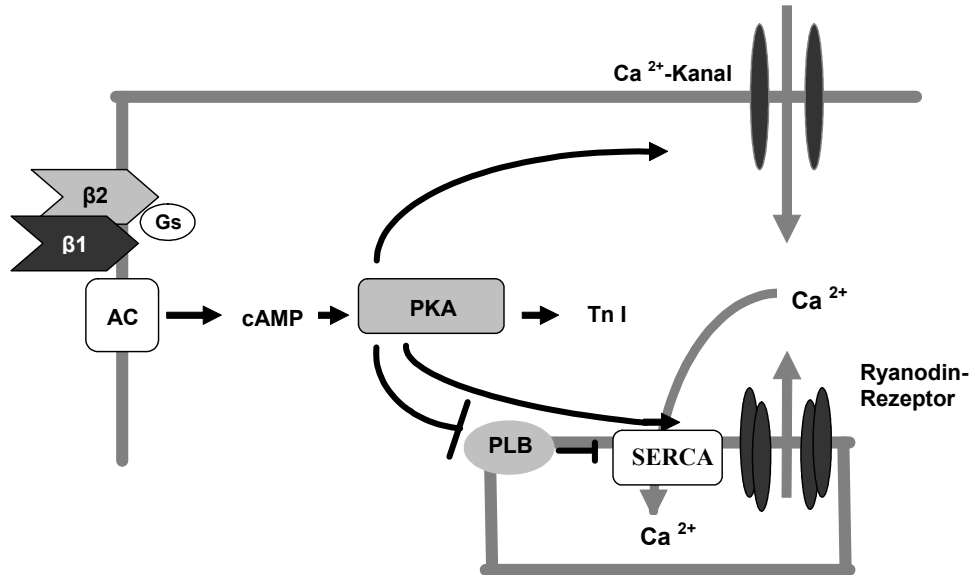


Abb. 2 : Signaltransduktion der β -adrenergen Rezeptoren. (nach LOHSE u. ENGELHARDT 2001); AR = Adrenorezeptor, Gs = stimulierendes G-Protein, AC = Adenylatzyklase, cAMP = cyclisches Adenosin-Monophosphat, PKA = Proteinkinase A, Tn I = Troponin I, PLB = Phospholamban, SERCA = Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums

Wird jedoch die Signalkaskade durch Isoprenalin ausgelöst, wird durch die Phosphorylierung von Phospholamban dessen inhibitorische Funktion auf die Ca^{2+} -ATPase aufgehoben (GARVEY et al. 1988). Die Kapazität der Ca^{2+} -ATPase, die durch die Inhibition nur eine Auslastung von 75 - 85 % erreicht, wird nach der Phosphorylierung des Phospholambans ausschließlich durch ihr thermodynamisches Limit begrenzt (WEINA et al. 1998). Die Folge ist eine erhöhte intrazelluläre Kalziumspeicherung im sarkoplasmatischen Retikulum und damit indirekt eine gesteigerte Kontraktilität der Herzmuskelzellen (LOHSE et al. 2003).

Die positiv chronotrope Wirkung des Isoprenalins basiert auf der Beeinflussung der Schrittmacheraktivität, die v.a. durch drei erhöhte Ionen-Einwärtsströme bewerkstelligt wird: I_f -Kanal, T-Typ Kalzium-Kanal und L-Typ Kalzium-Kanal.

Ausgangspunkt für die Schrittmacheraktivität ist die Hyperpolarisation des Membranpotentials (RODEN et al. 2002), die den I_f -Kanal aktiviert. Der I_f -Kanal ist überwiegend als elektrogener Einwärtsstrom aktiv (HAFNER 2005). Die über den I_f -Kanal in die Zelle gelangenden Natrium- und Kalium-Ionen leiten die langsame diastolische Depolarisation ein

(WEIDMANN 1951; NOBLE 1984). Im Rahmen der oben beschriebenen Signalkaskade wird durch eine cAMP-vermittelte Phosphorylierung des I_f -Kanals dessen Öffnung gesteigert. Durch die beginnende Depolarisation wird der T-Typ Kalzium-Kanal, dessen Reizschwelle niedriger als die des L-Typ Kalzium-Kanals ist, aktiviert und generiert einen geringen Einwärtsstrom von Kalzium-Ionen. Durch das positiver werdende Membranpotential öffnet sich der L-Typ Kalzium-Kanal, der zuvor durch die Proteinkinase A phosphoryliert wurde (s.o.), und der für den Aktionspotentialaufstrich verantwortliche Kalziumstrom fließt in die Zelle (KATZ 2001). Diese Prozesse werden unter Isoprenalin intensiviert, so dass die Schrittmacheraktivität und letztlich die Herzfrequenz beschleunigt werden.

Die positiv lusitrope Wirkung des Isoprenalins wird durch eine cAMP-aktivierte Phosphorylierung von Troponin I und von Phospholamban vermittelt. Das phosphorylierte Troponin I vermindert die Kalzium-Affinität zum Troponin C und die während der Kontraktion vorherrschende Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes wird aufgehoben (s. Abb. 3). Das Sperrprotein Tropomyosin nimmt wieder seine blockierende Position zwischen den Myosinköpfen ein und der Herzmuskel relaxiert.

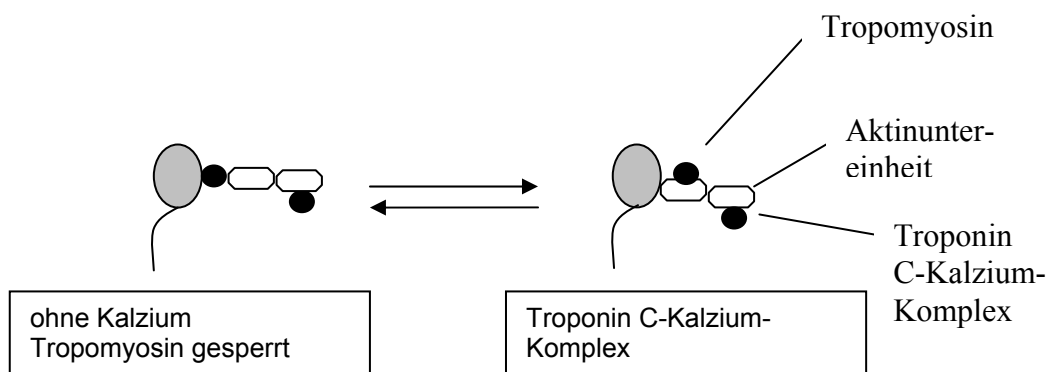


Abb. 3 : Wirkung eines Kalzium-Moleküls auf die Position von Tropomyosin (nach von ENGELHARDT u. BREVES 1999)

Ferner ist auf Grund des blockierten Phospholambans eine schnelle Kalzium-Rückspeicherung in das sarkoplasmatische Retikulum möglich, so dass im Zytosol nur wenig Kalzium zur Verfügung steht. Je geringer der Kalzium-Gehalt im Zytosol ist, desto schneller gibt das Troponin I gebundenes Kalzium ab (v. ENGELHARDT u. BREVES 1999). Insgesamt wird dadurch die Relaxation des Herzens beschleunigt (KATZ 2001).

2.4.2.2 Aconitum napellus (blauer Eisenhut)

Die zweite Möglichkeit der Arrhythmieinduktion besteht in der Anwendung des Extraktes Aconitum napellus, eine der giftigsten Pflanze Europas (MUTSCHLER 1996 a). Das im Blauen Eisenhut (Aconitum napellus) befindliche Alkaloid Aconitin ist in der ganzen Pflanze

zu finden. Die Konzentration des Giftes ist in den Knollen mit bis zu 3 % und in den Blättern mit bis zu 1,3 % am höchsten. Die letale Dosis liegt für einen Erwachsenen bei 2 - 6 mg reinen Aconitins (das entspricht ca. 2 - 4 g Wurzel). Die Giftaufnahme kann oral, aber auch transcutan beim Pflücken dieser Pflanze erfolgen.

Aconitin ist ein lipidlösliches Neurotoxin, dessen Hauptwirkung auf einer Erhöhung des Natrium-Stroms bei einer zeitgleich fehlenden Inaktivierung eines Teils der Natrium-Kanäle basiert (PEPER u. TRAUTWEIN 1967), die zu einer Verzögerung der finalen Repolarisationsphase eines Aktionspotentials und letztlich zum Kammerflimmern führt (MATSUDA et al. 1959). Die Manipulation der Natrium-Kanäle erfolgt über die Gating-Mechanismen der Natrium-Kanäle:

Natrium-Kanäle besitzen zwei verschiedene Gating-Mechanismen, m und h, durch die das Öffnen und Schließen der Kanäle im Rahmen eines Aktionspotentials kontrolliert wird. Ein initiales Schwellenpotential bewirkt eine Aktivierung des m-Gates, wodurch der Natrium-Kanal geöffnet wird. Gleichzeitig veranlasst das Schwellenpotential einen langsameren Prozess, der die h-Gates schließt und damit inaktiviert (KATZ 2001). HODGKIN u. HUXLEY postulierten 1952, dass jedes Gate zwei Zustände aufweist: geschlossen und offen. Da beide Gates offen sein müssen, damit ein einwärts gerichteter Natriumstrom die Zellmembran passieren und eine Depolarisation initiieren kann, definierten HODGKIN u. HUXLEY 1952 drei Kanal-Konformationen (s.Tab. 3) :

Tab. 3: Die Natrium-Kanalkonformation in Abhängigkeit vom m- und h-Gate

Kanal-Konformation	Zustand m-Gate	Zustand h-Gate
geschlossen (ruhend)	geschlossen	offen
offen (aktiv)	offen	offen
geschlossen (inaktiv)	offen	geschlossen

Aconitin verändert die Gating-Mechanismen des m- und h-Gates, indem es an einen Rezeptor am Natrium-Kanal nahezu irreversibel bindet (HONERJÄGER 1982; HONERJÄGER U. MEISSNER 1983). Die Effektivität der Kanal-Modifikation ist abhängig vom funktionellen Status des Natrium-Kanals. Bindet Aconitin an bereits aktivierte (offene) Kanäle, so wird der Natrium-Einstrom erhöht und damit die periodische Depolarisation beschleunigt (HONERJÄGER 1982; HONERJÄGER U. MEISSNER 1983). Die offene Kanalkonformation wird demnach favorisiert.

m-Gate:

Das Alkaloid bedingt eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung der Natriumkanäle um -50 mV. Dadurch wird ein Teil der Natrium-Kanäle bereits im Ruhemembranpotential aktiviert und ein Leckstrom von Natrium-Ionen entsteht. Zudem bleiben die Natrium-Kanäle länger offen (HONERJÄGER 1982), da sie früher aktiviert wurden.

h-Gate:

Durch Aconitin wird die Inaktivierungskinetik verändert, indem es verstärkt die Inaktivierung der Natrium-Kanäle verlangsamt. Bei einer Fraktion der Kanäle fehlt die Inaktivierung vollständig, so dass sie permanent aktiviert sind (HONERJÄGER 1982). Dadurch verlangsamen sie bei -60 mV die finale Repolarisationsphase und schaffen den Ausgangspunkt für frühe Nachdepolarisationen (ADANIYA et al. 1994; SAWANOBORI et al. 1996;). Die verzögerte Inaktivierung ermöglicht des Weiteren die Aktivierung sogenannter stiller Natrium-Kanäle. Stille Natrium-Kanäle sind unter physiologischen Bedingungen elektrisch nicht aktiv, da das h-Gate schneller inaktiviert als das m-Gate aktiviert wird, d.h. dass beide Gates nie zeitgleich offen sind und deshalb kein Natrium-Strom über diese Kanäle in die Zelle gelangt (HONERJÄGER 1982). Die durch das Aconitin bedingte, verzögerte Inaktivierung des h-Gates ermöglicht nun eine zeitgleiche Öffnung beider Gates. Dadurch gelangen unter Aconitin mehr Natrium-Ionen in die Zelle.

Die Grundlage für die Arrhythmieentwicklung durch Aconitin ist die Verlangsamung der Repolarisation bei -60 mV während der vulnerablen Phase. Die Zeitspanne, in der sich die Natrium-Kanäle in unterschiedlichen Erholungsphasen befinden, wird als vulnerable Phase der Refraktärzeit bezeichnet. Da die Erholung der Natrium-Kanäle spannungsabhängig ist, befindet sich bereits ein Teil der Natriumkanäle im geschlossenen (ruhenden) Zustand. Vorzeitige Impulse (frühe Nachdepolarisationen) können diese Kanäle aktivieren, wodurch spontane Depolarisationen entstehen. Da andere Natrium-Kanäle noch inaktiv sind, kann eine Weiterleitung der Nachdepolarisation im Herzen durch einen unidirektionalen Block unterbrochen werden. Dies kann Bigeminus, Trigemini, Tachykardien, Reentry-Arrhythmien und Torsade-de-Pointes-Arrhythmien initiieren (HONERJÄGER 1982, HONERJÄGER et al. 1982; KATZ 2001), die zum Kammerflimmern degenerieren. Zusätzlich kann durch den hohen intrazellulären Natrium-Gehalt mittels des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers eine Kalziumüberladung der Zelle herbeigeführt werden, die neben einer leichten positiven Inotropie oszillatorische Nachdepolarisationen hervorrufen (MATSUDA et al. 1959; HONERJÄGER 1982; HONERJÄGER et al. 1982; NILIUS et al. 1986; ADANIYA et al. 1994). Dadurch werden vorzeitige Exzitationen ausgelöst (MATSUDA et al. 1959), denen

monomorphe / polymorphe ventrikuläre Kammertachykardien bis zum Kammerflimmern folgen (WATANO et al. 1999). In einem nach Langendorff isolierten Kaninchenherzen lösten $0,1 \mu\text{mol/l}$ Aconitin nach einer Entwicklung einer monomorphen Tachykardie innerhalb von $28,8 \pm 3,4$ min eine polymorphe ventrikuläre Tachykardie bei allen Tieren aus (ADANIYA et al. 1994).

Bei einem durch Aconitin ausgelösten Kammerflimmern des Herzens ist die therapeutische Anwendung von Antiarrhythmika der Klasse I (Klassifikation nach Vaughan Williams) von Vorteil, da diese den einwärts gerichteten Natrium-Strom hemmen (WINSLOW 1980). Jedoch beschreiben ADANIYA et al. (1994), dass Lidocain und Flecainid lediglich eine Verbesserung der polymorphen in eine monomorphe ventrikuläre Tachykardie bewirken, ohne einen Sinusrhythmus wieder herzustellen. Eine Vergiftung mit Aconitin, einem der stärksten Pflanzengifte Europas, ist ohne Therapie letal.

2.4.2.3 Elektrische Stimulation

Alternativ kann die elektrische Stimulation zur Erzeugung von Arrhythmien verwendet werden. Elektrische Widerstände bestimmen die Leitungsgeschwindigkeit der longitudinalen und transversalen Herzachse. Die longitudinale Erregungsleitung wird überwiegend durch Natriumkanäle getragen, wobei eine hohe Anzahl von Gap Junctions in den Glanzstreifen die Erregungsübertragung von einer Zelle zur nächsten unterstützen. Dadurch wird der longitudinale Widerstand vermindert und die Leitungsgeschwindigkeit ist hoch (WIT u. DILLON 1993). Die transversale Erregungsausbreitung wird ausschließlich von Gap Junctions bedingt, die jedoch nur in einer geringen Anzahl vorhanden sind (DHEIN et al. 1999). Der elektrische Widerstand ist deshalb relativ hoch und die transversale Leitungsgeschwindigkeit langsamer als longitudinal (WIT u. DILLON 1993). Das Vorkommen unterschiedlicher elektrischer Widerstände wird auch als Anisotropie bezeichnet. Wird das Herz stimuliert, so resultiert aus der elektrischen Stimulation eine epikardiale Aktivierung. Das Ausbreitungsmuster dieser Aktivierung beschreibt die longitudinale (V_L) und transversale Leitungsgeschwindigkeit (V_T) anhand von Isochronen. Isochrone sind Linien, innerhalb derer die Bezirke liegen, die in einem bestimmten Zeitintervall aktiviert wurden (DHEIN 1992). Sowohl unter Palmitoleinsäure als auch unter Ajmalin entsteht ein Isochronmuster, das eine veränderte Anisotropie aufweist. Damit entstehen unterschiedliche Aktivierungsmuster, die in der hier vorliegenden Arbeit als Vergleich für die Isochronmuster der Methanol-löslichen Leonurus-Fraktion dienen.

2.4.2.4 Referenzsubstanzen für die elektrische Stimulation

2.4.2.4.1 Ajmalin

Das nach Vaughan-Williams klassifizierte 1A Antiarrhythmikum Ajmalin ist ein Natriumkanalblocker und hemmt die schnellen spannungsabhängigen Natriumkanäle (HAFNER 2005). Dadurch wird die Phase 0 des Aktionspotentials, der schnelle depolarisierende Aufstrich, stark verzögert. Eine Verringerung der Amplitude des Aktionspotentials (BOJORGES et al. 1975) und der Erregungsleitungsgeschwindigkeit gehen mit einher (HAFNER 2005), so dass die AV-Überleitung und die Erregungsausbreitung am Vorhof und am Ventrikel protrahiert werden (KUSCHINSKY u. REUTER 1961; KATZ 2001). Da aus der Natriumblockade eine verminderte Natriumbeladung resultiert und über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher weniger Kalzium in die Zelle gelangt (DHEIN 1992) wird die Kontraktionskraft vermindert (KUSCHINSKY u. REUTER 1961; SCHOLZ 1988; UNGEMACH 2006). Zusätzlich verlängert Ajmalin die relative Refraktärzeit und damit die Aktionspotentialdauer, da es eine leichte Reduktion der Kalium-Auswärtsströme bewirkt (DOENECKE 1977; HAFNER 2005). Am Langendorff-Herzen ergaben Untersuchungen von KUSCHINSKY u. REUTER (1961) mit Ajmalin eine negative Inotropie und Bradykardie bei nicht signifikanten Veränderungen des koronaren Flusses.

2.4.2.4.2 Palmitoleinsäure

Palmitoleinsäure, eine natürlich vorkommende C-16 Fettsäure, ist ein effektiver Gap Junction-Entkoppler. Man nimmt an, dass durch eine Inkorporation der Palmitoleinsäure in die Plasmamembran die eigentliche Kanalkonformation und der dafür notwendige Dockmechanismus nicht zu Stande kommt (DHEIN et al. 1999). Gap Junctions befinden sich überwiegend in den Disci interkalares (Glanzstreifen) an den Zellpolen, aber auch in geringen Anteilen an den Zellseiten. Sie ermöglichen die Verbindung benachbarter Zellen. Beide Zellen bilden aus Proteinen Hemi-Kanäle, die sich über ihre Extrazellulär-Loops miteinander verbinden und so den Zellspalt überbrücken (DHEIN 1998). Sie sind für die transversale Erregungsleitung und den Stoffaustausch zwischen benachbarten Zellen von großer Bedeutung, da transversal ausschließlich über die Gap Junctions Signale weitergeleitet werden. Durch diese elektrische Zellsynchronisation kann das Herz als funktionelles Synzytium agieren (DHEIN u. JONGSMA 2004). Bei einer EC_{50} von $5 \mu\text{mol/l}$ entkoppelt die Palmitoleinsäure benachbarte Zellen (BURT et al. 1991). Dosisabhängig ($> 10 \mu\text{mol/l}$) verändert sich unter Palmitoleinsäure das epikardiale Erregungsmuster und die Dispersion der lokalen Potentialdauer wird erhöht. Die atrioventrikuläre Überleitungszeit und die ventrikuläre Leitung werden verlangsamt, wobei die transversale Leitung V_T stärker betroffen ist als die longitudinale Leitung V_L (DHEIN et al. 1999; DHEIN u. HAMMERATH

2001; DHEIN 2004). Unter Kontrollbedingungen beträgt V_L $0,56 \pm 0,1 \text{ ms}^{-1}$ und V_T $0,26 \pm 0,07 \text{ ms}^{-1}$. Unter Palmitoleinsäure ist bei einer Konzentration von $20 \text{ } \mu\text{mol/l}$ eine Verlangsamung der transversalen Leitungsgeschwindigkeit auf $0,14 \pm 0,06 \text{ ms}^{-1}$ und der longitudinalen Leitungsgeschwindigkeit auf $0,36 \pm 0,06 \text{ ms}^{-1}$ zu verzeichnen (DHEIN et al. 1999).

2.5 Kardiologische Untersuchungen beim Kaninchen

Im Folgenden sollen einige diagnostische Parameter speziell für Kaninchen erläutert werden, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, um einen Einblick in physiologische und pathologische Begebenheiten zu ermöglichen. Die bisher über Herzerkrankungen bei Kaninchen vorliegenden Angaben beschränken sich auf experimentell induzierte Erkrankungen oder beschreiben genetisch induzierte Defekte in Laborzuchten (LEE et al. 1976). KATTINGER et al. untersuchten 1999 Kaninchen, die anamnestisch Symptome aufwiesen, die bei Hund und Katze auf eine Herzerkrankung deuten können. Zu diesen Symptomen gehören Dyspnoe, Bewegungsunlust, Schwäche, Inappetenz, Abmagerung, Apathie, Anfälle und Ataxien (TILLEY 1989; KERSTEN u. MORISSE 2001). Um Herzkrankheiten zu diagnostizieren, können v.a. Elektrokardiographie (EKG) und Herzultraschall eingesetzt werden.

2.5.1 EKG

Bei elektrokardiographischen Untersuchungen wird die Auswertung durch die physiologisch vorkommende Niedervoltage erheblich erschwert. P-, R- und T-Zacken sind immer messbar, dagegen sind Q- und S-Zacken meist nicht vorhanden. Eine Herzfrequenz zwischen 190 und 330 Schlägen/min und ein Sinusrhythmus sind physiologisch. In Tab. 4 werden die physiologischen Werte aufgeführt.

Tab.4: Referenzwerte der Elektrokardiographie beim Kaninchen (KATTINGER et al. 1999)

<i>EKG - Parameter</i>	<i>Amplitudenhöhe / Dauer</i>
P-Welle	< 0,05 mV
R-Zacke	0,05 – 0,2 mV
T-Welle	0,01 - 0,05 mV
PQ-Intervall	0,04 – 0,07 s
QRS-Dauer	0,02 – 0,04 s

2.5.2 Herzultraschall

Anhand der Echokardiographie ist eine Darstellung des Herzen sowohl in der Längs- als auch in der Kurzachse und damit eine Beurteilung der Herzkontraktilität und –physiognomie möglich. In der folgenden Tabelle sind die physiologischen Herzparameter beim Kaninchen aufgezeigt: Die in der Studie von KATTINGER et al. 1999 am häufigsten auftretenden Herzerkrankungen waren altersunabhängige Veränderungen an den Atrioventrikular-Klappen

Tab. 5: Referenzwerte der Echokardiographie beim Kaninchen (EWRINGMANN 2005)
 LVEDD = linksventrikulärer Diameter in der Diastole, LVESD = linksventrikulärer Diameter in der Systole, IVSED = interventrikuläre Septumdicke in der Diastole, IVSES = interventrikuläre Septumdicke in der Systole, LVWED = linksventrikuläre Hinterwand in der Diastole, LVWES = linksventrikuläre Hinterwand in der Systole, FS = Verkürzungsfraktion

Parameter	Mittelwert (cm)	± (cm)
LVEDD	1,25	0,16
LVESD	0,75	0,15
IVSED	0,23	0,04
IVSES	0,38	0,04
LVWED	0,23	0,5
LVWES	0,41	0,08
FS (%)	41,2 %	6,18 %

in Form von Fibrosen. Eine durch Kaninchenschnupfen oder subkutane Abszesse initiierte bakterielle Endokarditis ist denkbar. Bei 30 % der untersuchten Kaninchen wurde eine dilatative Kardiomyopathie mit einer verminderten Kontraktionskraft und Dilatation der Ventrikel diagnostiziert. Die Therapie erfolgt nach den Richtlinien wie bei Hund und Katze (KATTINGER et al. 1999).

3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Männliche Kaninchen der Rasse weiße Neuseeländer mit einem Körpergewicht von 1500 bis 2500 g wurden von der Charles River GmbH, Kißlegg, Deutschland bezogen (Genehmigungsbescheid: Aktenzeichen 24-9162.11-01-T38/05; Regierungspräsidium Leipzig, Braustr. 2, 04013 Leipzig; 24.02.2005). Alle Kaninchen wurden frühestens 3 Tage nach der Einstellung verwendet und wurden mit einer Standarddiät und Wasser ad libitum bei einer Raumtemperatur von 18 °C einzeln gehalten.

3.2 Chemikalien und Pflanzenmaterial

Chemikalien

Acetonitril
 Ameisensäure, Essigsäure
 Anisaldehyd
 Aucubin
 Chloroform
 Chlorogensäure
 DC-Alufolien 20 x 20 Kieselgel 60 _{F254}
 Echinacosid
 Ethanol, unvergällt, 99 %
 Ethylazetat
 Glucose
 Kaffeesäure
 Kaliumdihydrogenphosphat
 Methanol
 NaSO₄ (wasserfreies)
 Natronlauge 0,1 mol/l
 Resonium A (Kationenaustauscher)
 Saccharose
 Schwefelsäure
 Toluol
 Verbascosid
 Leonurus cardiaca

Herkunft

BASF (2 x destilliert); Ludwigshafen, Deutschland
 BASF; Ludwigshafen, Deutschland
 Merck; Darmstadt, Deutschland
 Phytolab; Hamburg, Deutschland
 BASF (2 x destilliert); Ludwigshafen, Deutschland
 Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
 Merck; Darmstadt, Deutschland
 Phytolab; Hamburg, Deutschland
 Roth p. a.; Karlsruhe, Deutschland
 BASF (2 x destilliert); Ludwigshafen, Deutschland
 Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
 Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
 Merck; Darmstadt, Deutschland
 BASF (2 x destilliert); Ludwigshafen, Deutschland
 Merck; Darmstadt, Deutschland
 Grüssing; Filsen, Deutschland
 Sanofi-Synthelabo GmbH; Berlin, Deutschland
 Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
 Riedel-de-Häen; Seelze-Hannover, Deutschland
 BASF (2 x destilliert); Ludwigshafen, Deutschland
 Phytolab; Hamburg, Deutschland
 Caesar & Lorenz GmbH; Qualität gemäß der Europäischen Pharmakopoe Ausg. 4

3.2.1 Tyrode-Lösung

Die Tyrode-Lösung wurde bei $n = 3$ Versuchen mit einer Kalzium-Konzentration von 0,9 mmol/l statt mit 1,8 mmol/l durchgeführt. Die Chemikalien NaCl, CaCl_2 , MgCl_2 und DMSO

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung (Perfusionslösung) :

Na^+	:	161,11 mmol/l	Cl^-	:	147,95 mmol/l
K^+	:	5,36 mmol/l	Ca^{2+}	:	1,80 mmol/l
HCO_3^-	:	23,80 mmol/l	H_2PO_4^-	:	0,42 mmol/l
Mg^{2+}	:	1,05 mmol/l	Glukose	:	11,10 mmol/l

wurden von der Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland und die Chemikalien NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , KCl und Glucose wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland mit einem Reinheitsgrad pro Analyse bezogen.

3.2.2 St. Thomas Lösung

Zusammensetzung der St. Thomas Lösung

NaCl	91,6 mmol/l	KCl	14,8 mmol/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,2 mmol/l	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	15 mmol/l
KH_2PO_4	1,2 mmol/l	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1,2 mmol/l
Procainhydrochlorid	1 mmol/l	NaHCO_3	25 mmol/l

3.3 Pharmaka

Pharmaka

Aconitin
Ajmalin
Heparin
Isofluran
Isoprenalin
Ketamin
Lidocain 2 %
Medetomidin
Palmitoleinsäure
St. Thomas Lösung

Herkunft

Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
Merck; Darmstadt, Deutschland
Fa. Roche; Grenzach- Wyhlen, Deutschland
Fa. ESSEX; München, Deutschland
Sigma; Steinheim, Deutschland
Fa. Serumwerk; Bernburg, Deutschland
Vetoquinol GmbH; Ravensburg, Deutschland
Fa. Pfizer GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Merck; Darmstadt, Deutschland
Rhön-Kliniken AG; Park-Krankenhaus; Leipzig, Deutschland

3.4 Geräte

Geräte

Blutdruckmessgerät
Druck-Eichgerät

Modell

Infinity Delta United
Typ 367

Herkunft

Dräger; Lübeck, Deutschland
Hugo Sachs Elektronik; Deutschland

Geräte	Modell	Herkunft
Druckmessumformer	Hellige 218100; Registrier- teil 330-T	Hellige Recomed; Freiburg, Deutschland
EEG, EKG	Infinity Delta United	Dräger; Lübeck, Deutschland
Extraktionshülsen	30/100 mm	VEB Freiburger Zellstoff- und Papierfabrik zu Weissenborn, Deutschland
Feinwaage	Sartorius MC1, Analytik AC 210 P	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Gasflowmeter	L91652/24	Stöcker; München, Deutschland
Glaswaren		Merck; Darmstadt, Deutschland
Heizpilz	Cat No. CMU 1000/E; Serial No. 10686318	Elektrothermal Barnstead, Dubuque Iowa USA
Heizplatte, -magnetrührer	Heidolph M3 3001 K	Heidolph; Schwabach, Deutschland
HPLC-Anlage	Pumpe P580 UV/VIS- Detektor UVD 340 S Probengeber GINA 50 Software CHROMELEON	Fa. GynkoteK; München, Deutschland
Inhalationsverdampfer	Dräger Vapor 2000	Dräger; Lübeck, Deutschland
Lyophilisation	Tischgerät: Lyovac GT 2 Vakuumpumpe: Trivac D 4 B/D 8 B	Heraeus Holding GmbH; Osterode/Harz, Deutschland
Mühle	IKA Labortechnik MT 10 basic	IKA-Werke; Staufen, Deutschland
Perfusor	Perfusor VI	B. Braun; Melsungen, Deutschland
Perfusor	Orchestra module DPS	Fresenius Hemo Care; Alzenau- Hörstein, Deutschland
pH-Meter	pH 330i/SET	Wissenschaftlich - Technische Werk- stätten; Weilheim, Deutschland
RP 18 –Säule	LiChrospher 100 RP 18, 5µm	Merck; Darmstadt, Deutschland
Rotationsverdampfer	Pumpe Vacuubrand CVC2 Wasserbad Heidolph WB 2000 Rücklaufkühler Heidolph VV 2000	Vacuubrand; Wertheim, Deutschland Heidolph; Schwabach, Deutschland Heidolph; Schwabach, Deutschland
Soxhlet-Apparatur		Merck; Darmstadt, Deutschland
Stimulator	CRS-ST-01, -04; EXP	
Thermostat	Lauda MT	MGW; Königshafen, Deutschland
Trockenschrank	Typ T 6120 Heraeus Instru- ments	Heraeus Holding GmbH; Osterode/Harz, Deutschland
Trockenschrank	Modell 400	Memmert GmbH; Schwabach, Deutschland

Geräte	Modell	Herkunft
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 103 H	Schalltec; Meierfelder-Walldorf Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 102 H	Schalltec; Meierfelder-Walldorf, Deutschland
Ultraschallgerät	Vind-med 800 A	Sonotron; Horten, Norway
Waage	Sartorius PT 310	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Varifuge RF 4665 Heraeus Sepatech	Heraeus Holding GmbH; Osterode/Harz, Deutschland

3.5 Extraktion von *Leonurus cardiaca*-Kräuterdrogen

Extrahieren ist das Trennen von Stoffgemischen einer Pflanze durch Herauslösen löslicher Inhaltsstoffe mit Hilfe eines Lösungsmittels oder eines Lösungsmittelgemisches. Dabei bleiben zwei Komponenten, der Extrakt und der unlösliche Pflanzenrückstand, übrig. Prinzipiell lassen sich beim Extrahieren zwei Fraktionen unterscheiden. In der ersten Fraktion dringt das Lösungsmittel in alle beschädigten oder zerstörten Zellen ein. Alle Inhaltsstoffe werden ausgewaschen. Je feiner die Pflanzenzerkleinerung, desto größer ist der extrahierte Teil. In der zweiten Fraktion müssen Pflanzeninhaltsstoffe aus unbeschädigten Zellen durch Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten extrahiert werden (FRIEDLAND 1992). Da das Konzentrationsgefälle und damit die Extraktionsgeschwindigkeit laufend abnehmen, setzt man häufig Extraktionsverfahren ein, wo stets ein frisches Lösungsmittel für die Aufrechterhaltung des Gradienten verfügbar ist.

Der oberirdische Teil der getrockneten Krautdroge von *Leonurus cardiaca* wurde in einer Mühle zu einem Pulver mit einer durchschnittlichen Korngröße von 0,5 mm zerkleinert. Dieses grobe Pulver wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur dicht verschlossen aufbewahrt. Zu Beginn wurden drei verschiedene Extrakte aus *Leonurus cardiaca* herba hergestellt (s. Abb. 4, 1.)

3.5.1 Ethanol-Wasser-Extrakt

Von der getrockneten und pulversierten Krautdroge *Leonurus cardiaca* wurden 30 g mit 200 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (70 : 30) 24 Stunden bei Raumtemperatur bei 300 U/min gerührt. Mittels dieser Extraktion sollten mittel- bis starkpolare Substanzen gewonnen werden. Die Flüssigkeit wurde abfiltriert und bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal mit einem Volumen von 150 ml wiederholt. Beim letzten Auszug wurde die Extraktionsdauer auf 48 Stunden ausgedehnt. Alle drei flüssigen Auszüge wurden vereint und am Rotationsverdampfer bei einem Unterdruck von 120 mbar, der schrittweise auf 25 mbar gesenkt wurde, eingeeengt. Anschließend wurde der Extrakt mit

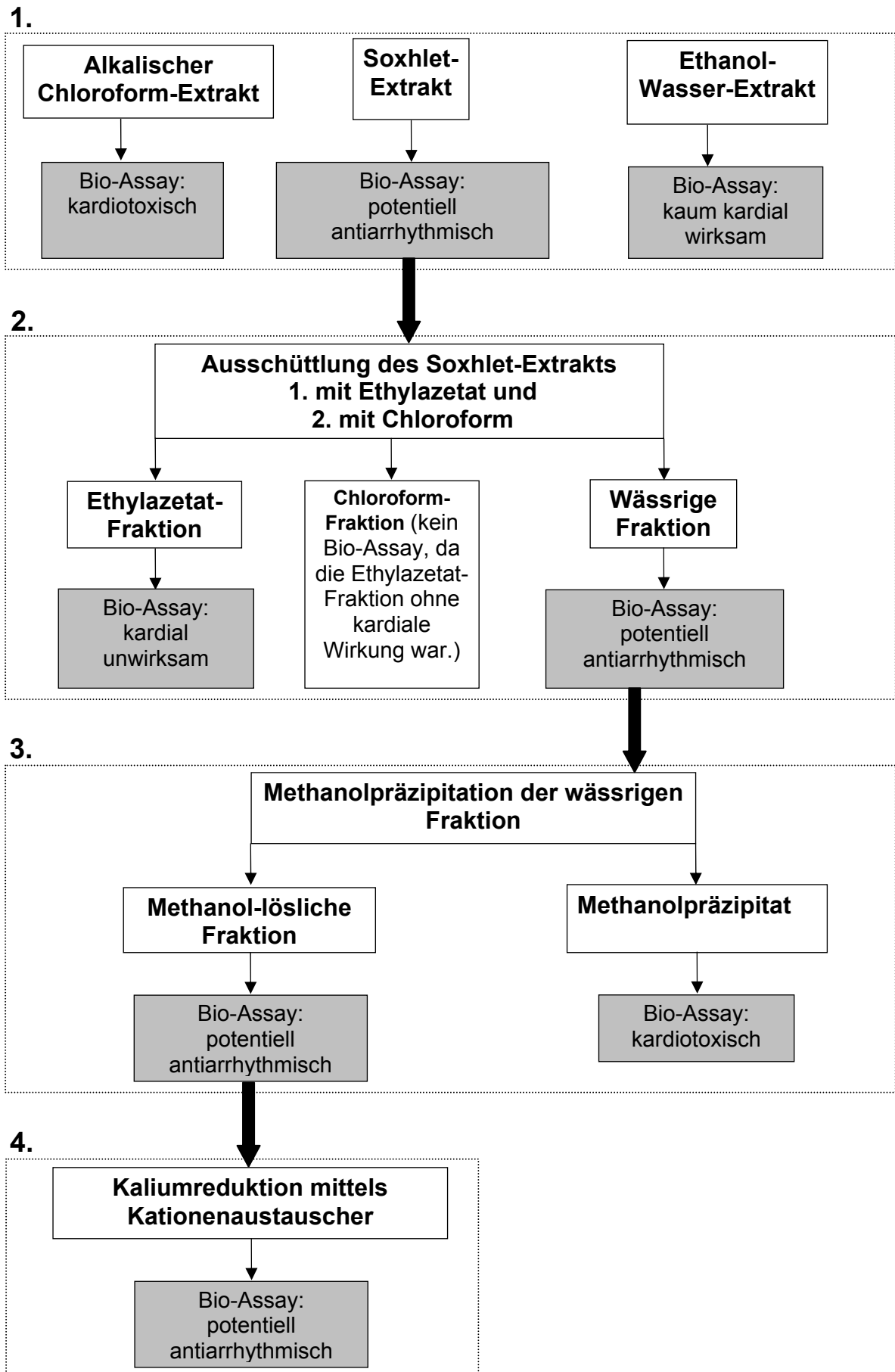


Abb. 4: Übersicht der durchgeführten Extraktionen und Fraktionierungen aus *Leonurus cardiaca*.

20 ml destilliertem Wasser aufgefüllt, 24 Stunden bei -20 °C tief gefroren und durch Lyophilisation zur Gänze getrocknet. Aus mehreren Ansätzen wurden im Durchschnitt 4,5 - 4,9 g Inhaltsstoffe aus 30 g Droge gewonnen, wobei der Extrakt eine grünliche Farbe und einen grasartigen Geruch aufwies. Die getrockneten Inhaltsstoffe wurden zum Schutz vor Licht und einer erneuten Wassereinlagerung im Tiefkühlschrank bei -20 °C aufbewahrt.

3.5.2 Alkalischer Chloroform-Extrakt

Von der getrockneten und pulverisierten Droge wurden 30 g mit 200 ml destilliertem Wasser und 150 ml Chloroform versetzt. Der pH wurde mit Ammoniak (25 %) auf einen Wert von 9 eingestellt. Dieser Ansatz wurde bei 50 °C 45 min auf einer Wärmeplatte mit 300 U/min gerührt. Ziel war die Extraktion lipophiler und alkalischer Substanzen. Die Droge wurde von den Lösungsmitteln abfiltriert und letztere durch einen Scheidetrichter voneinander separiert. Die Chloroform-Fraktion wurde mit 10 g wasserfreiem Natrium-Sulfat von Wassertröpfchen befreit. Die wässrige Fraktion wurde mit der Droge wieder zusammengeführt und weitere zwei Mal nach oben genanntem Schema mit Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Fractionen wurden vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer bei einem anfänglichen Unterdruck von 480 mbar, der schrittweise auf einen Enddruck von 25 mbar gesenkt wurde, bis zur Trockene eingengt. Die Temperatur des Wasserbades betrug 35 °C. Insgesamt konnten mit dieser Methode bei mehreren Ansätzen aus 30 g Droge im Mittel 0,39 - 0,42 g Pflanzeninhaltsstoffe aus den Chloroform-Fractionen gewonnen werden. Der dunkelgrüne Chloroform-Extrakt wies einen starken grasartigen Geruch auf. Die getrockneten Inhaltsstoffe wurden zum Schutz vor Licht und einer erneuten Wassereinlagerung im Tiefkühlschrank bei -20 °C aufbewahrt.

3.5.3 Soxhlet-Extraktion

In einer Soxhlet-Apparatur, die 1879 das erste Mal beschrieben wird (LIST U. SCHMIDT 1984 a), werden erschöpfende fest-flüssig Extraktionen durchgeführt. Dabei wird das im Rundkolben befindliche Extraktionsmittel bis zum Sieden erhitzt. Der Dampf kondensiert am Rückflusskühler und tropft auf das zu extrahierende Gut. Nach dem Durchtritt durch die Extraktionshülse steigt der Extrakt an der Außenseite des Filters bis zur Höhe des Heberohrs, durch das er in den Rundkolben abfließt. Nun steht das Lösungsmittel für eine neue Extraktion zur Verfügung. In der hier vorliegenden Arbeit wurden 10 g der zuvor pulverisierten Droge pro Extraktionshülse abgefüllt. Als Lösungsmittel wurden für 10 g Droge 200 ml destilliertes Wasser verwendet. Ziel war die Extraktion rein polarer Substanzen. Insgesamt wurden 10 Durchläufe absolviert. Der Extrakt hatte eine dunkelbraune Farbe und roch und schmeckte stark süßlich.

Anschließend wurde das Flüssigkeitsvolumen des gewonnenen Extraktes in einem Rotationsverdampfer eingeeengt. Durch den angelegten Druck konnte die Flüssigkeit verdampfen und die Inhaltsstoffe verblieben im Rundkolben. Zu Beginn wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Unterdruck von 100 mbar verwendet. Dadurch konnte ein zu plötzlicher Druckunterschied, ausgehend vom Umgebungsdruck der Luft, nicht zu einem Übersäumen des Extraktes in den Abfallkolben führen. Schließlich wurde der Druck schrittweise auf einen Enddruck von 25 mbar gesenkt. Die Temperatur des Wasserbades lag bei 35 °C.

Um vollständig getrocknete Pflanzeninhaltsstoffe zu erhalten, wurde der eingeeengte Extrakt mit 100 ml destilliertem Wasser aufgefüllt, über 24 Stunden bei -20 °C tiefgefroren und dann mindestens 48 Stunden bei -25 °C in einem einstufigen Modus lyophilisiert. Insgesamt wurden mit der Soxhlet-Apparatur bei mehreren Ansätzen aus 10 g pulverisierter Krautdroge durchschnittlich 1,5 - 2 g Pflanzeninhaltsstoffe gewonnen. Die getrockneten Inhaltstoffe wurden zum Schutz vor Licht und einer erneuten Wassereinlagerung im Tiefkühlschrank bei -20 °C aufbewahrt.

3.6 Fraktionierung des Soxhlet-Extraktes

Der Soxhlet-Extrakt zeigte am isolierten Herzen im Verhältnis zum Ethanol-Wasser-Extrakt und zum alkalischen Chloroform-Extrakt das vielversprechendste antiarrhythmische Potential. Auf Grund dessen wurde der Soxhlet-Extrakt unter Anwendung der Prinzipien der Ausschüttlung und der Präzipitation Bioassay-guided fraktioniert.

3.6.1 Ausschüttlung

Um eine Fraktionierung von Stoffgemischen zu erzielen, muss gewährleistet sein, dass beim Ausschütteln beide Lösungsmittel nicht miteinander mischbar sind. Die Extraktstoffe lösen sich in Abhängigkeit ihrer Polarität in den Lösungsmitteln und durch eine Fraktionsbildung der Lösungsmittel sind beide voneinander trennbar. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion basiert auf dem Nernst'schen Verteilungsgesetz (LIST u. SCHMIDT 1984 c): Verteilt sich ein Stoff auf zwei nicht mischbare Lösungsmittel, so ist das Verhältnis der Konzentrationen in beiden Flüssigkeiten konstant.

$$K' = \frac{C_1}{C_2} \quad (4)$$

K' = scheinbarer Verteilungskoeffizient (konstant)

C_1 = Konzentration des Stoffes in Fraktion 1

C_2 = Konzentration des Stoffes in Fraktion 2

In der hier vorliegenden Arbeit wurden je 4,5 g des Lyophysats des Soxhlet-Extrakts (s. Abb. 4, 2) in 150 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter gefüllt und mit 60 ml Ethylazetat per Hand 5 min ausgeschüttelt. Anschließend wurde die wässrige Fraktion von der Ethylazetatfraktion separiert. Die wässrige Fraktion wurde insgesamt dreimal mit 60 ml Wasser-gesättigtem Ethylazetat ausgeschüttelt. Alle drei Ethylazetatfraktionen wurden mit je 10 g wasserfreiem Natrium-Sulfat von Wassertröpfchen befreit und vereinigt. Im Anschluss wurde die mit Ethylazetat ausgeschüttelte wässrige Fraktion mit 40 ml Wasser-gesättigtem Chloroform 5 min per Hand ausgeschüttelt und in einem Scheidetrichter von der Chloroform-Fraktion getrennt. Die wässrige Fraktion wurde im Ganzen zweimal mit 40 ml Wasser-gesättigtem Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Ausschütteln wurden sowohl die wässrige als auch die Ethylazetat- und die Chloroformfraktion am Rotationsverdampfer eingengt. Das anzulegende Vakuum für die wässrige Lösung lag zu Beginn, wie oben beschrieben, bei 100 mbar. Der eingengte wässrige Extrakt wurde nach einer 24 stündigen Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch die Lyophilisation getrocknet. Insgesamt wurden bei mehreren Ansätzen im Mittel 3,5 - 4,4 g wässrige Pflanzeninhaltsstoffe, 0,06 – 0,09 g aus den Ethylazetatfraktionen und 0,002 – 0,004 g aus den Chloroformfraktionen gewonnen. Die aromatisch riechende wässrige Fraktion wies eine braune und die Ethylazetatfraktion eine hellgrüne Farbe auf.

3.6.2 Präzipitation

In der hier vorliegenden Arbeit wurde weiterhin die unterschiedliche Polarität von Pflanzeninhaltsstoffen bei Ausfällungsreaktionen ausgenutzt (s. Abb. 4, 3.). Stark polare Substanzen sind nur in Wasser, weniger stark polare Substanzen sind in Wasser und Alkoholen wie Ethanol oder Methanol löslich. Fügt man einem wässrigen Extrakt Methanol hinzu, so fallen stark polare Substanzen als Niederschlag aus.

Die mit Ethylazetat und Chloroform extrahierte wässrige Fraktion wurde mit Methanol gefällt. Dazu wurden jeweils 3 g lyophilisierte Trockenmasse der wässrigen Fraktion in einem Zentrifugenröhrchen in 7 ml Aqua dest. gelöst und mit 63 ml Methanol ergänzt, so dass ein Verhältnis Wasser/Methanol von 1:9 entsteht. Die Zentrifugenröhrchen wurden für eine Stunde im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ verbracht, um den Ausfällungsvorgang zu beschleunigen. Nach dem Ausfällen der in Methanol unlöslichen Substanzen wurde das Präzipitat in einer Zentrifuge bei 4000 Umdrehungen/min und $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min getrennt. Der flüssige Überstand wurde entnommen und in einem Rundkolben gesammelt. Der Niederschlag wurde mit 9 ml Aqua dest. gelöst. Es wurden 55 ml Methanol zugesetzt und anschließend wurde für 30 Minuten die Fällung bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wieder beschleunigt. Anschließend wurde zentrifugiert, abpipettiert und der zuletzt beschriebene Vorgang noch einmal wiederholt. Der Überstand aus allen drei Ausfällungen wurde in einem Rundkolben gesammelt, am

Rotationsverdampfer eingeengt, 24 Stunden bei -20 °C tiefgefroren und dann lyophilisiert. Es wurden aus 3 g ausgeschüttelten Lyophilisats 2,25 g Methanol lösliche und 0,75 g Methanol unlösliche Inhaltsstoffe gewonnen. Die Methanol-lösliche Fraktion wies eine braune Farbe und einen aromatischen Geruch auf.

3.6.3 Reduktion des Kaliumgehalts

Da die Frischpflanze *Leonurus cardiaca* einen Anteil von 0,2 % an Kaliumnitrat aufweist (BALANSARD 1936; ERSPAMER 1948; HEGNAUER 1966; KOZLOVA 1967), wurde der Kaliumgehalt der Methanol-löslichen Fraktion durch den Kationenaustauscher Resonium A reduziert (s. Abb. 4, 4.):

Von der lyophilisierten Methanol-löslichen Fraktion wurden 20 g mit 40 ml Aqua dest. gelöst. 4 g Resonium A wurden mit 8 ml Aqua dest. befeuchtet und anschließend mit der gelösten Fraktion vermengt. Bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz 30 min mit 250 U/min gerührt. Der Kationenaustauscher wurde in einer Zentrifuge 4 min bei 3000 U/min und 20 °C von der Fraktion separiert. Die Fraktion wurde abgenommen und erneut mit 4 g befeuchtetem Resonium A versetzt. Das mit Kalium beladene Resonium A wurde jeweils zweimal mit 1 ml Aqua dest. gespült und zentrifugiert, um ungebundene Pflanzeninhaltsstoffe wiederzugewinnen. Die Spüllösung wurde der Fraktion wieder zugeführt. Dieser Vorgang wurde insgesamt zehnmal wiederholt. Die in 1 g/ml Aqua dest. gelöste, Methanol-lösliche Fraktion enthielt eine Kaliumkonzentration von 188 mmol/l, das entspricht 0,188 mmol/g. Mittels des Kationenaustauschers wurde pro Gramm Fraktion die Kaliumkonzentration von 188 mmol/l auf 80 mmol/l reduziert, das entspricht 0,08 mmol/g Methanol-löslicher Fraktion.

3.6.4 Prozentuale Anteile der Soxhlet-Fractionen am Ausgangsextrakt

Mit der Fraktionierung des Soxhlet-Extrakts werden die Inhaltsstoffe aus *Leonurus cardiaca* auf Grund ihrer Polarität voneinander getrennt und stellen prozentuale Anteile am Gesamtextrakt dar. Im Folgenden werden diese Anteile aufgeführt.

In 1 g Soxhlet-Extrakt sind im Durchschnitt 0,082 g in Ethylazetat lösliche Inhaltsstoffe enthalten. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 1,82 %.

Im Mittel kommen 0,959 g der wässrigen Fraktion in 1 g Soxhlet-Extrakt vor. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 95,91 % am Gesamtextrakt.

In 1 g Soxhlet-Extrakt sind im Durchschnitt 0,158 g Methanol unlösliche Inhaltsstoffe und damit ein prozentualer Anteil von 15,8 % zu verzeichnen.

1 g Soxhlet-Extrakt enthält im Durchschnitt 0,719 g Methanol-lösliche Inhaltsstoffe. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 71,9 %.

3.7 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine alte Analysenmethode, bei der eine bewegliche (mobile) Fraktion an einer ruhenden (stationären) Fraktion vorbeiströmt und dabei ein Stoffgemisch in seine Komponenten auftrennt. Das Trennprinzip basiert auf einer Adsorptionschromatographie. Dabei werden gelöste Teilchen reversibel an die Phasengrenze der stationären Phase angelagert und in Abhängigkeit von den einwirkenden Adsorptionskräften (Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) unterschiedlich lang verzögert (SCHWEDT 1996) (s. Abb. 5). In dieser Arbeit wurde eine Normalphasen-Chromatographie verwendet, deren Charakteristika eine polare stationäre und eine unpolare mobile Fraktion sind. Die Polarität der Oberfläche wird durch Silanol-Gruppen bewirkt. Je polarer die Pflanzeninhaltsstoffe, desto stärker werden sie verzögert (ADAM u. BECKER 2000). Kieselgel 60 ist die heutzutage am häufigsten eingesetzte stationäre polare Fraktion (HAHN-DEINSTROP 1998).

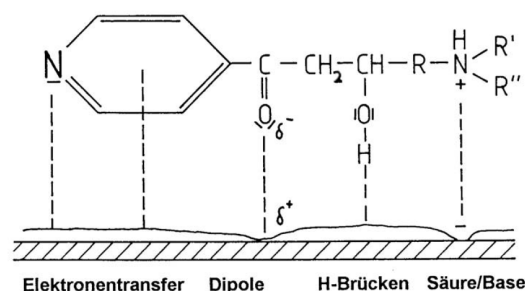


Abb. 5: Mögliche Interaktion zwischen einer stationären Fraktion und einer Verbindung.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden sämtliche DC-Platten zur Vorreinigung in destilliertes Methanol gestellt und anschließend an der Luft getrocknet. Das Auftragen der Proben erfolgte manuell und die Trennung der Stoffgemische vertikal. Die Startlinie für die Proben lag bei 2,5 cm und die Laufstrecke betrug 15 cm. Sämtliche Chromatographien wurden ohne Kammersättigung bei Raumtemperatur durchgeführt. Die hier im Folgenden erwähnten Methoden stammen aus WAGNER u. BLADT (1983).

Für die Dünnschichtchromatographie der wässrigen und alkoholischen Extrakte bzw. Fraktionen aus *Leonurus cardiaca* wurde der Methodengrundsatz für Herzglykoside übernommen und entsprechend modifiziert, da sich das Fließmittel als Screening für verschiedenartige Stoffe eignet:

Mobile Fraktion (100 ml) :	Ethylazetat : Methanol : Wasser (65 : 25 : 10)
Stationäre Fraktion :	Kieselgel 60
Detektion :	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz Thymol-Schwefelsäurereagenz (nach Besprühen im Trockenschrank bei 100 °C, 5-10 min. erhitzen)
Probenmenge :	30 µl (20 mg/ml)
Proben gelöst in :	- Wässrige Extrakte bzw. Fraktionen wurden in Aqua dest. gelöst. - Alkoholische Extrakte/Fraktionen wurden in Methanol gelöst.

Ohne großen apparativen Aufwand können die DC-Platten ausgewertet werden. Dabei wurden die Auswertungen unter Tageslicht und unter Zuhilfenahme von kurz- und langwelligem UV-Licht durchgeführt.

1. Detektion bei Tageslicht:

Die visuelle Direktauswertung von Substanzen mit Eigenfarbe ist der erste Schritt bei der Begutachtung einer DC-Platte.

2. Detektion bei UV 254 nm:

Platten mit einem Fluoreszenzindikator wie z.B. manganaktiviertem Zinksilikat zeigen bei einer Bestrahlung mit kurzwelligem Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) eine gelbgrüne Emission. Dies hat den Vorteil, dass alle UV-aktiven Substanzen als dunkle Flecken auf hell emittierendem Untergrund wegen einer Fluoreszenzminderung bzw. -löschung erscheinen. UV-aktive Substanzen weisen in der Regel konjugierte π -Elektronensysteme auf (HAHN-DEINSTROP 1998).

3. Detektion bei UV 365 nm:

Eine Anregungswelle von 365 nm hebt Substanzen mit Eigenfluoreszenz, -lumineszenz hervor. Dabei erscheint der Untergrund dunkel und die Substanzen, die im UV-Bereich absorbieren, sind als hell leuchtende Flecken visuell wahrnehmbar.

Die oben beschriebenen Schritte sind nur bei Substanzen möglich, die eine Eigenfarbe, Eigenfluoreszenz oder UV-Licht absorbierende Komponenten enthalten. Verbindungen ohne solche Eigenschaften können mit Hilfe der Derivatisierung visuell wahrnehmbar werden.

Derivatisieren bezeichnet die Überführung der nicht wahrnehmbaren Substanzen in erfassbare Hilfssubstanzen. Eine derartige Umsetzung kann als Universalreaktion oder durch funktionelle Gruppen auch selektiv erfolgen (HAHN-DEINSTROP 1998). Das Prinzip basiert auf einer Verschiebung in den bathochromen Bereich auf Grund von Elektronenübergängen, d.h. die Lichtabsorption erfolgt in längeren Wellenlängen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde zur Derivatisierung Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz zur Universalreaktion und Thymol-Schwefelsäure-Reagenz zur selektiven Reaktion mit Zuckern verwendet. In der Literatur ist der genaue Wirkmechanismus von Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz mit den in *Leonurus cardiaca* enthaltenen Stoffen nicht beschrieben. Die Zucker werden anhand der Seliwanow-Reaktion kenntlich gemacht. Die Seliwanow-Reaktion nutzt die Bildung der Verbindung 5-Hydroxymethyl-Furfural aus Hexosen durch die Einwirkung starker Mineralsäuren. Diese Verbindungen werden dann mit Resorcin umgesetzt und ein roter Farbstoff ist sichtbar. Keto-Zucker reagieren schneller als Zucker mit Aldehydgruppen, so dass dadurch eine Unterscheidung möglich ist.

3.8 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie ermöglicht eine schnelle Auftrennung von Stoffgemischen unter hohem Druck, die von Detektoren in Form eines Chromatogramms dargestellt werden. Zur Qualifizierung der Methanol-löslichen Fraktion wurde bei 20 °C unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Gemischen mit 0,03 % Phosphorsäure eine Gradientenelution (s. Tab. 6) unter 60 bar auf RP-18-Trennmateriale mit einer Korngröße von 5 µm durchgeführt ohne eine Vorsäule zu verwenden. Dazu wurde eine 0,5 % Phosphorsäure-Stammlösung mit Aqua dest. hergestellt und zu 5 ml der Stammlösung jeweils 95 ml Wasser bzw. Acetonitril hinzugefügt. Die Methodenansätze wurden auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit phenolischer Inhaltsstoffe von *Leonurus cardiaca* mit denen von *Echinacea radix* von dieser übernommenen (BAUER et al. 1988). Zu den Inhaltsstoffen von *Echinacea radix* gehören u.a. Rutin, Quercetin, Polysaccharide und Kaffeesäure (BAUER et al. 1988). Zudem wurden, wie bei *Leonurus cardiaca*, die hydrophilen Inhaltsstoffe dieser Herba-Drogen mit Methanol extrahiert und als Fingerprint dargestellt (BAUER et al. 1986; BAUER et al. 1988). Die Reversed-Phase-Chromatographie (RP) hat sich zu der häufigsten Trennmethode entwickelt. 60 - 70 % der heutigen Trennprobleme von Substanzen unterschiedlichster Polarität lassen sich mit RP-Phasen lösen (WEBER u. TEGELKAMP 2001). Es werden eine unpolare stationäre und eine polare mobile Fraktion verwendet (GOTTWALD 1992).

Insgesamt wurden in 200 µl Aqua dest. und 950 µl Methanol 2 mg der Methanol-löslichen Fraktion gelöst. Bei 20 °C wurden nach der Präkonditionierung der Säule mit Phosphorsäure-haltigem Wasser in die Probenschleife maschinell 20 µl Probe injiziert und die Inhaltsstoffe mittels Gradientenelution getrennt (s. Tab. 6):

Tab. 6: Zeitliche Darstellung der Gradientenelution

	<i>Time (min)</i>	<i>Flow (ml/min)</i>	% Acetonitril + 0,03 % H_3PO_4	% Wasser + 0,03 % H_3PO_4
1		0,50	0,0	100,0
2	2,00	0,50	0,0	100,0
3	4,00	0,50	19,0	81,0
4	8,00	0,50	19,0	81,0
5	12,00	0,50	100,0	0,0
6	35,00	0,50	100,0	0,0

Bei einer Wellenlänge von 220 nm konnte ein Fingerprint der Methanol-löslichen Fraktion dargestellt werden. Die Ermittlung der Reproduzierbarkeit der oben genannten HPLC-Methodik wurde mit n = 6 durchgeführt.

3.9 Versuche am isolierten Herzen

Im Folgenden wird der Versuchsablauf, der zur Untersuchung der aus *Leonurus cardiaca* gewonnenen Extrakte verwendet wurde, näher erläutert. Ziel dieser Untersuchungen ist die Beurteilung, ob *Leonurus cardiaca* kardiogen wirksam ist oder nicht.

3.9.1 Vorarbeit

3.9.1.1 Versuchsvorbereitung

Die frische Tyrode-Lösung wurde ca. eine Stunde vor Versuchsbeginn angesetzt, in beide Säulen der Langendorff-Apparatur gefüllt und durch eine Begasung mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) auf einen pH-Wert = 7,4 +/- 0,04 eingestellt. Des Weiteren wurde über einen Thermostat eine Temperatur der Tyrode-Lösung von 39 °C erzeugt, so dass im Herzen eine konstante Temperatur von 37 °C gewährleistet werden konnte. Die für die Datenaufzeichnung notwendigen Geräte wurden ebenfalls ca. 1 Stunde vor Versuchsbeginn eingeschaltet.

3.9.1.2 Versuchstiovorbereitung, -präparation

Alle Kaninchen wurden intramuskulär mit 0,2 mg/kg Medetomidin sediert, mit 20 mg/kg Ketamin anästhesiert und ca. 10 min. vor Versuchsbeginn intravenös mit 1000 IE/kg heparinisiert. Die narkotisierten Tiere wurden über die Aa. carotides entblutet. Vom Abdomen ausgehend wurde der Thorax mit einem Fischmaulschnitt entlang der Rippen eröffnet und das Diaphragma entfernt. Nun wurden die Rippen mit dem Sternum leicht nach proximal angehoben, damit das dadurch unter Zug stehende Perikard mit einem Schnitt eröffnet werden konnte. Im Anschluss wurden die Rippen mitsamt Sternum Wirbelsäulennah abgetrennt und der Thymus, falls vorhanden, von der Aortenwurzel stumpf abpräpariert. Sowohl die Aorta als auch die A. pulmonalis wurden nach einer Inzision kanüliert, wobei über die Edelstahlkanüle der Aorta 10-20 ml eisgekühlte St. Thomas-Lösung (s. 3.2.2) injiziert wurde. Damit konnte ein sofortiger aber reversibler Herzstillstand erzeugt und somit der Sauerstoff- und Energieverbrauch des Herzens vermindert werden. Die V. cava superior wurde separat von der Massenligatur um die Hohlvenen und Pulmonalvenen ligiert, um die Sinusknotenfunktion nicht zu beeinträchtigen. Das so präparierte Herz konnte nun über die Aortenkanüle an die Langendorff-Apparatur verbracht und durch die dortige Perfusion mit begaster Tyrode-Lösung reanimiert werden. Die Zeit zwischen dem Töten des Tieres und dem Einbringen der Aortenkanüle betrug maximal 1 ½ Minuten.

3.9.1.3 Berechnung der einzusetzenden Extraktmenge

Da die Extrakte bei der Herstellung gefriergetrocknet wurden, um ausschließlich das Gewicht der extrahierten Pflanzeninhaltsstoffe zu erhalten, wurden die Extrakte vor Versuchsbeginn in Form einer Stammlösung verflüssigt (s. Tab. 7), aus der dann die im Versuch einzusetzende Extraktmenge entnommen wurde.

Tab. 7: Lösungsverhältnis der Extrakte bzw. Fraktionen

Extrakt	Lösungsmittel
Soxhlet-Extrakt	1 g Extrakt / 1 ml Aqua dest.
Chloroform-Extrakt	0,25 g Extrakt / 1,5 ml DMSO + 0,5 ml Aqua dest.
Ethanol-Wasser-Extrakt	0,6 g Extrakt / 1,5 ml Aqua dest. + 0,5 ml DMSO
Ethylazetat-Fraktion	82 mg Extrakt / 1,3 ml DMSO + 0,7 ml Aqua dest.
Wässrige Fraktion	0,959 g Extrakt / 1 ml Aqua dest.
Methanol-lösliche Fraktion	1 g Extrakt / 1 ml Aqua dest.
Kalium-reduzierte Fraktion	1 g Extrakt / 1 ml Aqua dest.
Methanol-Präzipitat	1 g Extrakt / 1 ml Aqua dest.

Der Koronarfluss der isolierten Kaninchenherzen war individuell unterschiedlich. Um die in Vorversuchen ermittelte gewünschte Extrakt-Konzentration im Herzen zu erhalten, muss in Abhängigkeit vom koronaren Fluss die Konzentration in der Spritze berechnet werden:

$$\text{Infusionskonzentration} = \frac{\text{Endkonzentration Herz} \times \text{Koronarfluss}}{\text{Perfusionsfluss}} \quad (5)$$

Perfusionsfluss : 1 ml/min

Endkonzentration : gewünschte Extraktkonzentration im Herzen in mg/ml (z.B. 0,1 mg/ml)

Koronarfluss : Efluat des Herzens in ml/min

Infusionskonzentration: x mg/ml Tyrodelösung

Alle aus dem Soxhlet-Extraktionsverfahren gewonnenen Fraktionen wurden bei diesen Versuchen am isolierten Herzen berücksichtigt. Dadurch können die natürlichen Verhältnisse

Tab. 8: In Gleichung (5) einzusetzende Endkonzentrationen; - : In diesen Konzentrationen wurden keine Versuche durchgeführt. Die kursiv geschriebenen Konzentrationen der Methanol-löslichen Fraktion entsprechen der Kalium-reduzierten Fraktion.

Ausgangsextrakt Konzentrationen	Extraktfraktionen Konzentrationen			
Soxhlet-Extrakt	Ausschüttlung Ethylazetat	Ausschüttlung wässrig	Methanol- lösliche Fraktion	Methanol- Präzipitat
0,1 mg/ml	0,00182 mg/ml	0,0959 mg/ml	0,0719 mg/ml	0,016 mg/ml
0,5 mg/ml	-	0,479 mg/ml	-	-
1,0 mg/ml	0,0182 mg/ml	0,959 mg/ml	0,719 mg/ml	0,16 mg/ml
3,0 mg/ml	-	-	2,16 mg/ml	0,48 mg/ml
3,5 mg/ml	-	-	2,5 mg/ml	-
5,0 mg/ml	-	-	3,59 mg/ml	-

wie sie in der Pflanze vorherrschen, beachtet und eine unnatürliche Verstärkung der Extraktwirkungen am Herzen vermieden werden. Ist z.B. eine Extrakt-Konzentration am Herzen von 0,1 mg/ml erwünscht, wird von den einzelnen Fraktionen nur der entsprechende prozentuale Anteil des Soxhlet-Extraktes, der der Ausgangsextrakt ist, eingesetzt. Im Fall der Ethylazetat-Fraktion sind 0,00182 mg/ml der natürliche Anteil an 0,1mg/ml Soxhlet-Extrakt. Tab. 8 zeigt die unterschiedlichen Anteile jeder Fraktion.

3.9.2 Versuchsdurchführung

3.9.2.1 Messprinzip

Das epikardiale Erregungsausbreitungsmuster wurde mit Hilfe eines Multi-Elektroden-Verfahrens gemessen. Diese Mapping-Technik ermöglicht die vollständige Vermessung des Herzens bezüglich der epikardialen Erregungsursprungspunkte sowie der Analyse der Erregungsausbreitung. Des Weiteren sind Inhomogenitäten und Dispersionsunterschiede während der Repolarisation messbar (Kleber et al. 1978; DHEIN et al. 1993). Dazu wurden vier mit der Herzkontraktion mitschwingende Elektrodenplatten aus Polyester, die jeweils 8 x 8 unipolare AgCl-Elektroden mit einem Abstand von 1 mm beinhalten, an die Herzoberfläche gedrückt, ohne Änderungen des Koronarflusses oder des linksventrikulären Drucks hervorzurufen. Dadurch wurde an 256 Stellen der Ventrikeloberfläche das extrazelluläre epikardiale Potential abgegriffen. Durch die zeitliche Differenz der Potentiale konnten die Aktivierungszeitpunkte bestimmt werden.

3.9.2.2 Langendorff-Apparatur

Um die Vitalfunktionen der isolierten Kaninchenherzen während der Versuche erhalten zu können, mussten mit der Apparatur hinsichtlich physiologischer Bedürfnisse des Herzens alle notwendigen Vitalparameter gewährleistet und konstant gehalten werden. Es wurde eine modifizierte Langendorff-Apparatur nach Abb. 6 eingesetzt. Die mit Tyrode gefüllte Boyle-Mariott'sche Flasche (D) diente als Vorratsgefäß und hielt, auf Grund ihrer erhöhten Position, einen konstanten Perfusionsdruck von 70 cm H₂O aufrecht. Mittels dessen konnten die isolierten Kaninchenherzen druckkonstant perfundiert werden. Von der Boyle-Mariott'schen Flasche gelangte das Perfusionsmedium in zwei doppelwandige Glassäulen (A), wo die Begasung mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) über im Boden integrierte Glasritzen (B) erfolgte. Über die Begasung wurde der pH-Wert auf $7,4 \pm 0,04$ eingestellt. Um im Herzen eine Temperatur von 37 °C zu erreichen, wurde durch einen Thermostat mittels eines Warmwasser-Kreislaufs die äußere Wandung der Glassäulen auf 39 °C temperiert. Beide Säulen vereinigen sich nach einem zwischengeschalteten Vier-Wege-Hahn zu einem Endstück, an das das frisch präparierte Herz mit der Aortenkanüle angeschlossen wurde. Ein Vier-Wege-Hahn (C) ermöglichte die Verbindung einer der beiden Säulen mit dem isolierten Herzen, so dass die Perfusionslösung durch den hydrostatischen Druck in die Koronarien gelangte. Zu kontinuierlichen Erfassung des linksventrikulären Drucks wurde nach einer 15-minütigen Akklimatisierung über den linken Vorhof in den linken Ventrikel des Herzens ein Latex-Ballon eingeführt, mit einer Vorhofligatur fixiert und über Füllung des Ballons mit Aqua dest. auf einen enddiastolischen Druck von 6 - 8 mm Hg gebracht. Im Anschluss wurden die vier Elektrodenplatten derart an die Herzoberfläche gedrückt, dass die Platten den

Herzbewegungen folgen konnten, wobei die Lage der Platten auf der Herzoberfläche über bewegliche Aufhängeapparate bestimmt wurde. Sowohl der enddiastolische als auch der linksventrikuläre Druck sowie der Koronarfluss und die ST-Hebung wurden durch die Elektrodenplatten nicht beeinflusst. In den Versuchen wurden die vier Platten nicht verschoben. Die Versuche, bei denen dies im seltenen Fall geschah, wurden abgebrochen.

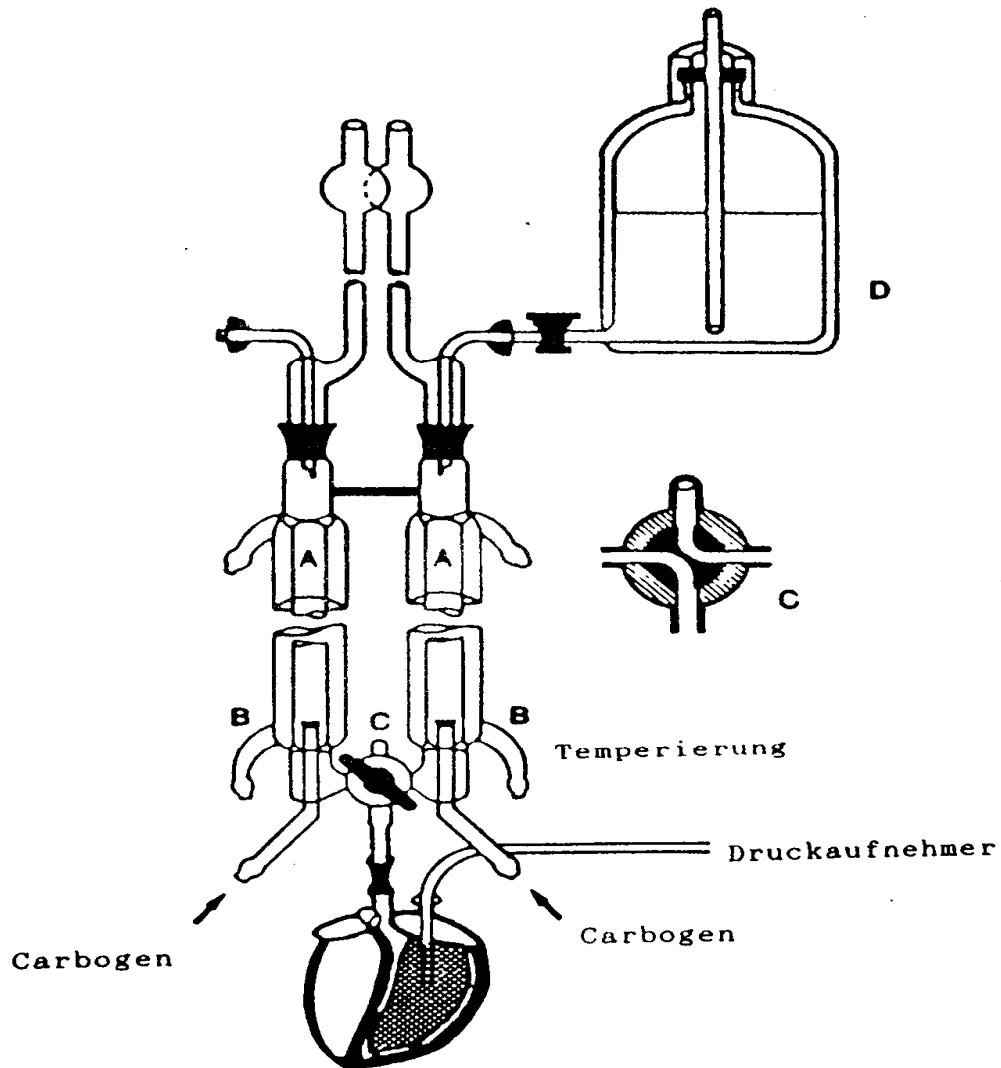


Abb.6: modifizierte Langendorff-Apparatur zur Erhaltung der Vitalfunktionen des isolierten Herzens (zeitlich begrenzt) (nach DHEIN 1992)

3.9.2.3 Versuchsprotokoll

Um die Vorgehensweise in den Versuchen zeitlich konstant zu halten und damit eine Vergleichbarkeit der Versuchsdaten zu ermöglichen, wurden alle Versuche nach dem Schema in Abb. 7 durchgeführt:

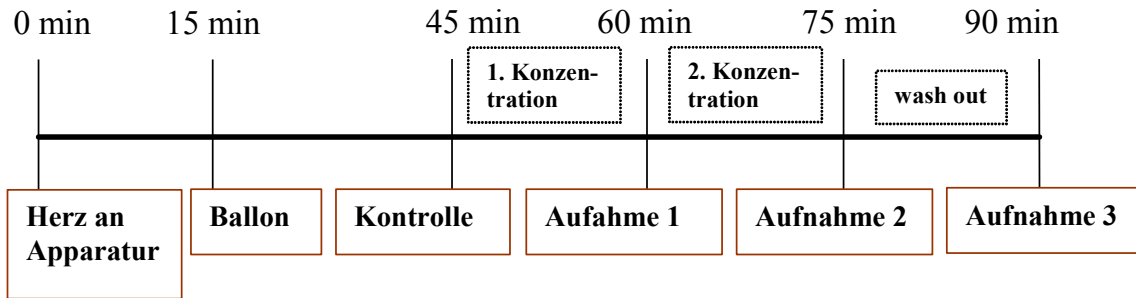


Abb. 7: Darstellung des Versuchprotokolls; die Anzahl der Extrakt- bzw. Fraktionskonzentrationen konnte erhöht werden, so dass sich lediglich die Versuchsdauer verlängerte. Alle Extrakte/Fraktionen wurden mit 1 ml/min infundiert.

3.9.2.4 Versuchsprotokoll der Arrhythmie Modelle

Es wurden insgesamt drei Arrhythmie Modelle durchgeführt, anhand derer das Ausmaß der Wirkungseffekte der Methanol-löslichen Fraktion näher charakterisiert werden konnte.

1. Aconitin-Modell:

Mit Hilfe dieses Modells (s. Abb. 8) konnte überprüft werden, ob die Methanol-lösliche Fraktion eine Natrium-Kanal blockierende Wirkung aufwies. Eine Tyrodelösung mit einer Endkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Aconitin (ADANIYA et al. 1994; SAWANABORI et al. 1996) wurde mit 0,5 ml/min und bei 2 Herzen mit 0,75 ml/min in das Herz perfundiert, bis eine monomorphe ventrikuläre Tachykardie (MVT) ausgelöst wurde. Danach wurde unter anhaltender Aconitingabe die Methanol-lösliche Fraktion mit 1 ml/min parallel infundiert. Der wash out erfolgte unter 0,5 % DMSO in Tyrodelösung als Perfusat.

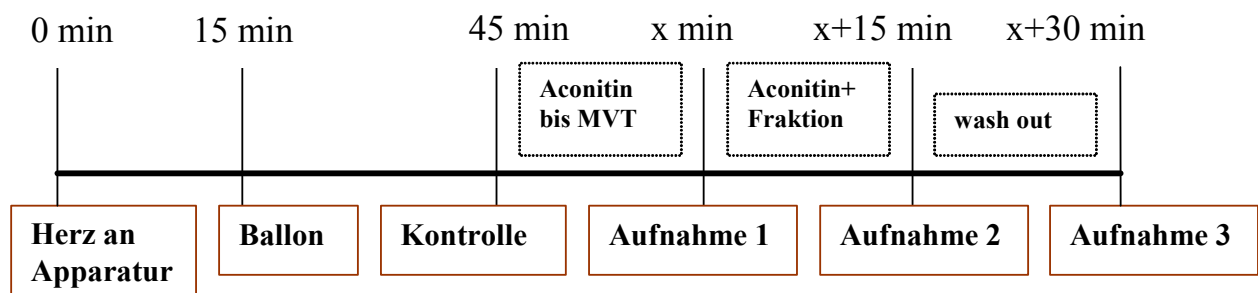


Abb. 8: Schematische Darstellung des Aconitin-Arrhythmie Modells

2. Elektrische Stimulation:

Anhand dieses Modells konnte ermittelt werden, ob die Methanol-lösliche Fraktion eine Reizschwellenerhöhung und damit ein prophylaktisches antiarrhythmisches Potential verzeichnete.

Über zwei an der Hinterwand des Herzens in der Elektrodenplatte befindliche zentrale Elektroden wurde ein elektrischer Impuls auf das Herzgewebe übertragen. Die gesendete Spannung wies eine positive Polarität und eine Pulsperiode von 5 Hz auf. Das Prinzip basierte darauf, dass die angelegte Spannung die Autonomie des Herzens übernahm und somit ein 1 : 1 Capture-Verhältnis den Herzrhythmus bestimmte. Löste man ein Capture-Verhältnis in der Kontrolle aus, so konnte die Reizschwelle, die zum Auslösen einer Arrhythmie notwendig war, charakterisiert werden. Die Fraktion wurde in Konzentrationen von 2,16 mg/ml und 3,59 mg/ml infundiert. Als Referenzsubstanzen wurden Ajmalin (1 µmol/l) (DHEIN 1992) als klassischer Na⁺-Kanal-Blocker und Palmitoleinsäure (10 µmol/l) (DHEIN et al. 1999) als typischer Gap Junction-Blocker gewählt. Die Versuche wurden nach dem Modus in Abb. 9 durchgeführt.

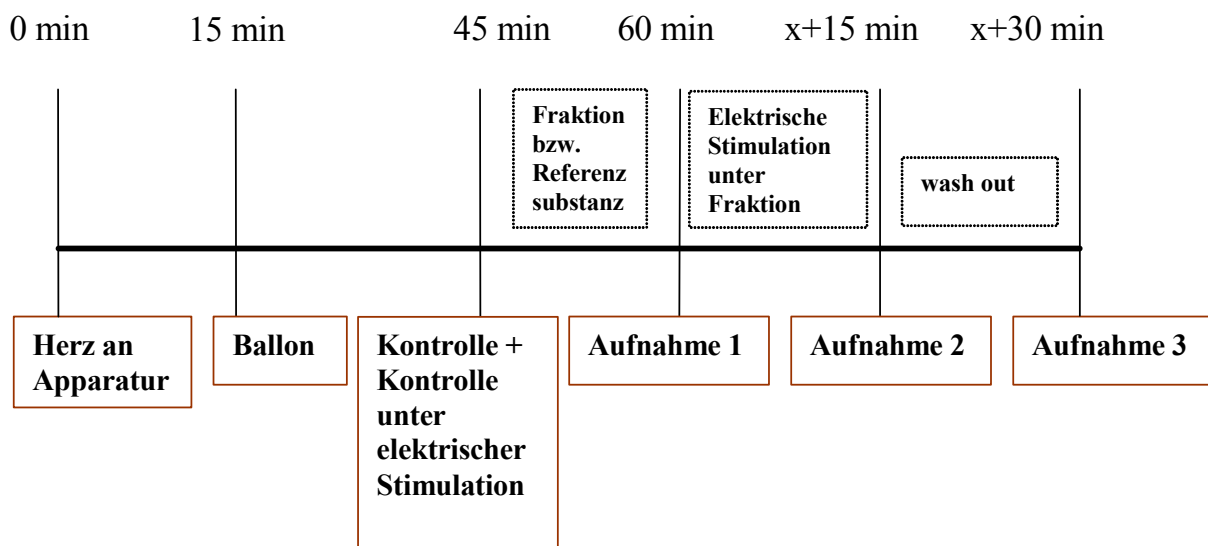


Abb. 9: Schematische Darstellung des Arrhythmie-Modells mit elektrischer Stimulation; Referenzversuche mit Ajmalin und Palmitoleinsäure wurden äquivalent anstelle der Fraktion durchgeführt.

3. Isoprenalin

Dieses Arrhythmie-Modell ermöglichte die Überprüfung einer β -blockierenden Wirkung seitens der Methanol-löslichen Fraktion.

Um eine sympathomimetische Tachykardie auszulösen, wurde Isoprenalin in Form einer Dosis-Wirkungskurve in 6 ansteigenden Konzentrationen (1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/l) in das isolierte Kaninchenherz infundiert (CARROLL et al. 1997). Nach einem wash out von 10 min. wurde die Methanol-lösliche Fraktion mit einer Konzentration von 2,16 mg/ml parallel zur Isoprenalin-Dosis-Wirkungskurve appliziert (s. Abb. 10).

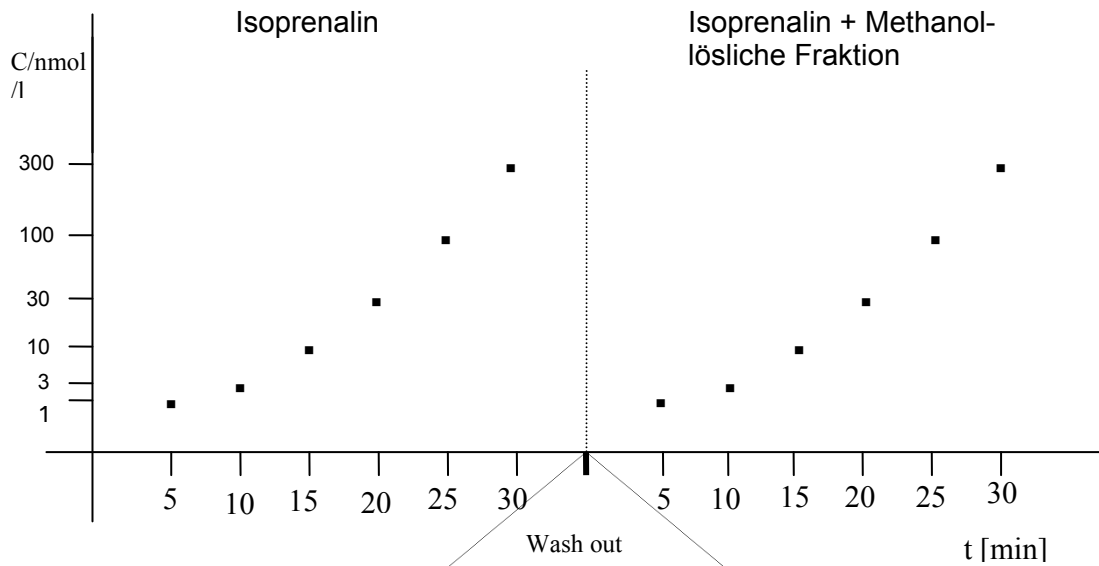


Abb. 10: Schematische Darstellung des Arrhythmie-modells mit Isoprenalin; C = Konzentration, t [min] = Zeit

3.9.2.5 Datenerfassung

Linksventrikulärer Druck

Der in den linken Ventrikel eingeführte Ballon ist über einen PVC-Schlauch mit einer drucksensiblen Membran verbunden, deren Widerstandsänderung, entsprechend der Kompressionsänderung des Ballons, über eine Wheatston'sche Brücke bestimmt und kontinuierlich aufgezeichnet werden konnte (DHEIN 1992). Vor jedem Versuch wurde die Messbrücke geeicht.

Datenaufzeichnung und -speicherung

Die verwendete Hardware ermöglicht die Registrierung epikardialer Potentiale mittels vier Elektrodenplatten. Die unipolar geschalteten Elektroden mit einer 8 x 8 Matrix sind mit Verstärkern verbunden. Über eine Multiplexermatrix werden die registrierten Potentiale auf einen Operationsverstärker übertragen und von dort auf einen Analog-Digital-Wandler. Die digitalisierten Daten können nun in einen Speicher geschrieben und von dort auf einen IBM – kompatiblen PC zur Datensicherung, Online-Versuchsüberwachung und zur Analyse transferiert werden. Online konnten insgesamt 8 der 256 Kanäle (2 pro Elektrodenplatte) permanent überwacht werden (DHEIN 1992). Zur Elimination nieder- und hochfrequenter Störungen befindet sich die gesamte Versuchsanordnung in einem Faraday-Käfig.

Die PC-Software besteht aus vier Grundprogrammen (DHEIN 1992):

Das erste Programm ermöglicht die schematisierte Zuordnung eines jeden der 256 Kanäle des Frontendrechners HAL 4 zu einer genau definierten anatomischen Lage auf der

Herzoberfläche. Das zweite Programm erlaubt die Datenübertragung vom Frontendrechner auf den PC, die Datenüberwachung sowie die Änderung von Messbereichen, die Darstellung von 8 Online-Kanälen als EKG-Registrierung und die Abspeicherung eines Datensatzes. Dem dritten Programm unterliegt die Primärdatenanalyse, mittels dessen automatisiert die Aktivierungszeitpunkte zu dem Zeitpunkt, an dem der maximale Spannungsabfall (dU/dt_{\min}) (DURRER u. VAN DER TWEEL 1954; SPACH u. DOLBER 1986) und Repolarisationszeitpunkte, an dem die maximale Spannungssteigerung auftrat, festgelegt wurden. Der Experimentator ist zusätzlich in der Lage, die Aktivierungs- und Repolarisationszeitpunkte zu kontrollieren und zu korrigieren. Aus diesen ergab sich die Gesamtaktivierungszeit (TAT), die lokale Potentialdauer (ARI) und die ST-Hebung. Das letzte Grundprogramm ist für eine erweiterte Datenanalyse zuständig. Aus den analysierten Daten konnten die Elektroden ermittelt werden, die als erste aktiviert und auch als Erregungsursprungspunkte bezeichnet wurden. Die Aktivierungszeitpunkte konnten des Weiteren in einer Vektormatrix verrechnet werden, die der Analyse der Schlag-zu-Schlag Variabilität diene.

3.9.3 Datenanalyse, -auswertung

3.9.3.1 Elektrophysiologische Parameter

Die epikardiale Mapping-Technik (s. 3.9.2.1) ermöglicht die Darstellung von epikardialen Potentialen. Anhand derer ließen sich die Aktivierungs- und Repolarisationszeitpunkte sowie andere Parameter bestimmen, die eine Aussage über die Erregungsausbreitungsmuster und –geschwindigkeiten erlauben. Die elektrophysiologischen Parameter werden im folgendem erläutert:

1. Gesamtaktivierungszeit (TAT) :

Die Gesamtaktivierungszeit (total activation time, TAT) ergibt die Spanne von der ersten bis zur letzten aktivierten Elektrode und beschreibt damit die Aktivierungs- und Erregungsdynamik in allen vier Herzarealen.

2. Aktivierungszeiten (ACT) und Erregungsausbreitung (VEC):

Die Aktivierungszeitpunkte geben Auskunft, wann die sich unter den Elektroden befindlichen Bereiche des Herzens aktiviert werden. Dazu wurde der Zeitpunkt mit dem stärksten Spannungsabfall automatisch von der Datenanalyse gewählt und, falls notwendig, vom Experimentator manuell korrigiert.

Aus den Aktivierungszeitpunkten und den dazu gehörigen Elektroden konnten Vektorfelder erstellt werden. Ausgehend von den inneren 36 Elektroden jeder Platte wurden die

Aktivierungszeitpunkte und die Lage der aktivierten Elektroden ermittelt. Zu den 8 umliegenden, noch im Ruhezustand befindlichen Elektroden, wurde die zeitliche Differenz der Aktivierung berechnet und so Einzelvektoren mit räumlichen Angaben errechnet (s. Abb. 11). Ausgehend von der Elektrode, die zuerst aktiviert wurde, können folglich Einzelvektoren in einem Radius von 360 ° entstehen. Beim Vergleich der Vektorfeldunterschiedlichkeit von Schlag-zu-Schlag wurden Vektoren mit einer Abweichung $< 5^\circ$ als gleich bewertet (Dhein 1992). Alle Einzelvektoren wurden zu einem Aktivierungsvektor addiert, aus dessen Vektorfeld dann die Hauptrichtung und der Verlauf des Erregungsausbreitungsmusters erkennbar waren. Die Vektorfeldähnlichkeit liegt unter Kontrollbedingungen bei 25 - 35 % (DHEIN et al. 1993). Ein prozentueller Vergleich der Vektorfelder bei Kontroll- und Versuchsreihen wurde durchgeführt.

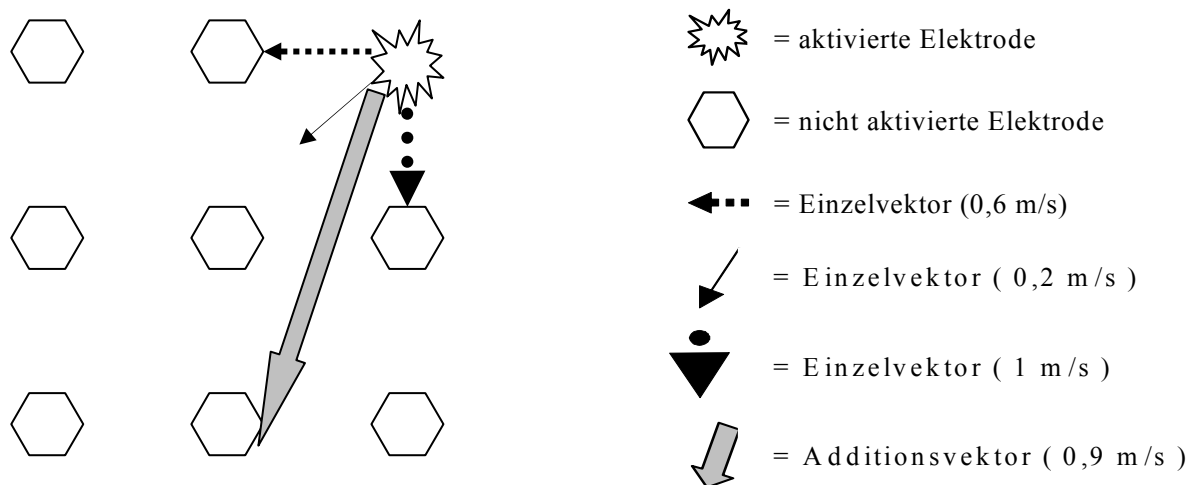


Abb. 11: Vektorerstellung der Erregungsausbreitung

3. Erregungsausbreitungs- (VEL) und Leitungsgeschwindigkeit (PTP):

Die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit (m/s) wird als mittlere Geschwindigkeit für alle vier Herzareale, aus der Geschwindigkeit an den Einzelelektroden, berechnet. Die Peak-to-Peak-Amplitude, die Gesamtamplitude des QRS-Komplexes, ist ein Maß für die lokale Ausbreitungsgeschwindigkeit und wird ebenso erstellt.

4. Erregungsursprungspunkte (BTP) :

Erregungsursprungspunkte sind Elektroden, die zeitlich vor allen anderen Elektroden aktiviert werden (ARISI et al. 1983). Für alle Versuchsreihen wurden die Erregungsursprungspunkte bestimmt und prozentualisiert. Dadurch war der Vergleich zwischen Kontroll- und Versuchswerten möglich. Prinzipiell waren jedoch auch konstante

Erregungsursprungspunkte zu verzeichnen. SICOURI u. ANTZELEVITCH (1991) konnten eine neue Kardiomyozytenart verifizieren, die, auch als M-Zellen bezeichnet, vermutlich an den Ausläufen der Purkinje-Fasern vorhanden sind. Untersuchungen zeigten, dass 70 - 80 % der konstanten Erregungsursprungspunkte tatsächlich an den Endigungen der Purkinje-Fasern lokalisiert waren und die 20 - 30 % transmuralen BTP von intramuralen Wellen stammen (DHEIN et al. 1993).

5. Lokale Potentialdauer (ARI):

Aus der Differenz zwischen der Aktivierungszeit und der Repolarisationszeit jeder Elektrode konnte die lokale Potentialdauer errechnet und ein Mittel für die vier Herzareale gebildet werden. Die Standardabweichung von ARI wird als Dispersion von ARI bezeichnet.

6. Wellenlänge (lambda, L):

Die Wellenlänge Lambda konnte durch das Verhältnis der lokalen Potentialdauer zur lokalen Geschwindigkeit bestimmt werden.

$$L = VEL \times ARI \quad (6)$$

Je ähnlicher sich die Wellenlängen in einem Bezirk waren, desto höher war die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Reentry-Kreisen. Ebenso beinhaltete eine Verringerung der Wellenlänge ein proarrhythmisches Potential (SMEETS et al. 1986).

7. ST-Mapping (ST):

Um intramurale Veränderungen des Herzens feststellen zu können, wurde ein ST-Mapping durchgeführt. Dabei wurde besonders die ST-Hebung oder –Senkung betrachtet, die ein Hinweis auf ischämische oder generalisierte Bezirke darstellte. Die Hälfte der Strecke von der Spitze der R-Zacke bis zum Ende der T-Welle stellt den Zeitpunkt t (ARI 50 %) dar (DHEIN 1992).

$$ST = \sum_Y (P_{(x,t)} - (P_{o(x)})) \quad (7)$$

$$y = 1 - 256$$

$P_{(x,t)}$ = epikardiale Potential am Ort x zu einem Zeitpunkt t

$P_{o(x)}$ = isoelektrisches Potential am Ort x

8. QRS und PQ als EKG-Parameter:

Die QRS- und PQ-Zeit wurde im Rahmen eines jeden Versuches gemessen.

3.9.3.2 Funktionelle Parameter

Funktionelle Parameter stellten der linksventrikuläre Druck, die Zykluslänge und der Koronarfluss dar.

Linksventrikulärer Druck (LVP)

Nach dem oben beschriebenen Modus (s. 3.9.2.5) konnte der linksventrikuläre Druck gemessen werden. Sowohl der endsystolische als auch der enddiastolische linksventrikuläre Druck wurden dokumentiert, so dass festgestellt werden konnte, ob eine negative Inotropie oder ein beginnendes Herzversagen in Betracht kam.

Basale Zykluslänge (BCL)

Die BCL beschrieb die Geschwindigkeit zwischen zwei aufeinander folgenden Herzaktionen, aus der die Frequenz des Herzens errechnet werden konnte.

Koronarfluss (CF)

Über die Aortenkanüle gelangte die begaste Tyrodelösung in das isolierte Kaninchenherz. Da der hydrostatische Druck nicht höher als 50 mm Hg (= 70 cm Wassersäule) gewählt wurde und die Aortenklappen des Herzens deshalb geschlossen waren, konnte die Tyrodelösung zur Versorgung des Arbeitsmyokards in die Koronararterien strömen. Von dort aus erreichte das Perfusat über die Koronarvenen den Sinus coronarius im rechten Atrium. Auf Grund der Herzkontraktionen konnte das Perfusat in den rechten Ventrikel gepumpt und über die kanülierte A. pulmonalis ausgeworfen werden. Dieser Auswurf war als der Koronarfluss messbar. Der relative Koronarfluss (rCF) beschreibt das Verhältnis des Koronarflusses zum linksventrikulären Druck und der Herzfrequenz eines Herzens. Der Koronarfluss verschiedener Herzen ist damit vergleichbar.

$$rCF = CF/[LVP \times HF] \quad (8)$$

rCF = relativer Koronarfluss LVP= linksventrikulärer Druck
HF = Herzfrequenz CF = Koronarfluss

3.9.4 In-vivo -Versuche

3.9.4.1 Versuchstiovorbereitung

Um während der In-vivo -Versuche eine konstant leichte Narkosetiefe zu gewährleisten, wurde im Anschluss an die oben genannte Injektionsnarkose eine Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Die geringe Narkosetiefe wurde durch den vorhandenen Licht- und

Korneareflex überprüft. Allen Tieren wurde subkutan im dorsalen Zervikalbereich die Erdung für das EEG implantiert. Zur Messung des Blutdrucks wurde die frei präparierte A. femoralis verwendet. Anhand der Veränderungen von EEG und Blutdruck sowie von Licht- und Korneareflex wurde untersucht, ob die Narkosetiefe sich verändert und der Extrakt somit auch zentralnervöse Wirkungen besitzt.

3.9.4.2 Versuchsablauf

Zu Beginn wurde bei allen Kaninchen zur Überprüfung der physiologischen Herzparameter ein Herzultraschall in rechter Seitenlage durchgeführt, wobei sowohl die Längs- als auch die Kurzachse dargestellt wurden. Es wurde eine Messung des interventrikulären Septums, des linksventrikulären Diameters und der linksventrikulären Hinterwand in Systole und Diastole durchgeführt und damit die Ejektionsfraktion und die Verkürzungsfraktion bestimmt. Im Anschluss wurde das EKG angelegt.

Da ein Kaninchen ein Blutvolumen von 120 ml/2 kg (DHEIN 2005 a) aufweist und von 5 mg/ml, dem Maximum bisher eingesetzter Fraktionskonzentrationen, ausgegangen wurde, wurden 600 mg der Methanol-löslichen Fraktion in 5 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst. Der Blutfluss der Tiere wurde nicht mit einbezogen, da ein wash out, wie er beim isolierten Herzen zu Stande kommt, in einem geschlossenen Kreislauf nicht möglich ist.

Nach der Dokumentation von Lichtreflex, Laborwerten, Blutdruck, EKG und EEG im Kontrollzustand, wurde die Methanol-lösliche Fraktion infundiert. Über 10 Minuten wurden im Minutentakt bei einer Infusionsgeschwindigkeit der Fraktion von 1,5 ml/min die oben genannten Parameter überprüft und aufgezeichnet. Anschließend wurde für weitere 5 Minuten die Infusionsgeschwindigkeit auf 2 ml/min erhöht und nach gleichem Modus alle Parameter dokumentiert. Ebenso wurde mit der Kalium-reduzierten, Methanol-löslichen Fraktion verfahren.

3.9.4.3 Datenerfassung

Die Parameter von Blutdruck, EKG und EEG wurden alle 10 sec registriert. Die Kurven von EKG und Blutdruck hatten eine Amplitude von 200 Hz und vom EEG 100 Hz.

3.9.5 Statistik

3.9.5.1 Versuchsserien

Alle Versuchsserien mit den Extrakten bzw. Fraktionen, die Hinweise auf eine potentiell antiarrhythmische Wirkung zeigten, wurden mit $n = 6$ durchgeführt. Diejenigen Extrakte bzw. Fraktionen, in denen keine potentiell antiarrhythmischen Effekte kenntlich gemacht werden konnten, wurden mit $n = 3$ veranschlagt. Ausnahme ist die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion, die mit $n = 3$ getestet wurde. Alle Arrhythmie-Modelle wurden mit $n = 6$ getestet. Alle In-vivo -Versuche und die Referenzsubstanzen der elektrischen Stimulation, Ajmalin und Palmitoleinsäure, wurden mit $n = 2$ durchgeführt. Auf Grund der geringen Versuchsanzahl wurde bei $n = 2$ keine Signifikanz errechnet. Die in dieser Arbeit gemachten Angaben sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern ($MW \pm SEM$).

3.9.5.2 Signifikanz

Um signifikante Unterschiede bestimmen zu können, wurde der Wilcoxon-Test zur Analyse aller Messwerte eingesetzt. War die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$, so wurden diese Messwerte gegenüber der Kontrolle als signifikant angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 In-vitro -Versuche - Extraktwirkungen auf das isolierte Herz

Die Herzwirksamkeit von *Leonurus cardiaca*, einer seit Jahrhunderten gegen „nervöse“ Herzbeschwerden als Tee eingesetzten Pflanze, konnte wissenschaftlich bislang nicht ausreichend untermauert werden (DAB-KOMMENTAR 1999). Durch verschiedene Extraktionsmethoden wurden drei Extrakte hergestellt, die vornehmlich unterschiedliche Inhaltsstoffe und damit möglicherweise unterschiedliche Wirkprinzipien aufwiesen (s. 3.5). Im folgenden Text sollen die Effekte der einzelnen Extrakte auf das isolierte Kaninchenherz dargestellt werden. Zunächst werden dabei die Wirkungen der drei Ausgangsextrakte dargestellt: der Ethanol-Wasser-Extrakt (s. 3.5.1), der alkalische Chloroform-Extrakt (s. 3.5.2) und der Soxhlet-Extrakt (s. 3.5.3). Im Anschluss daran werden die Auswirkungen der Fraktionen des Soxhlet-Extrakts (s. 3.6.1 – 3.6.3) beschrieben. Alle Werte sind als MW \pm SEM angegeben. Die Auswahl der Konzentrationen der Extrakte orientierte sich an der Wirkung am isolierten Herzen.

4.1.1 Kontrollwerte der funktionellen und elektrophysiologischen Parameter

Um die Effekte der Extrakte und Fraktionen am Herzen beurteilen zu können, sind in Tabelle 9 die Parameter unter Kontrollbedingungen der gesamten Versuche angegeben.

Tab. 9: Parameter zur Beurteilung der Funktionalität des Herzens unter Kontrollbedingungen mit n = 50.

<i>Parameter</i>	<i>Werte unter Kontrollbedingungen</i>
Linksventrikulärer Druck (LVP)	75 \pm 3 mm Hg
Basale Zykluslänge (BCL)	393 \pm 11 ms
Koronarfluss (CF)	30 \pm 1,2 ml/min
Relativer Koronarfluss (rCF)	0,0027 \pm 0,001 ml/mm Hg
Gesamtaktivierungszeit (TAT)	16,5 \pm 1,65 ms
Lokale Potentialdauer (ARI)	140 \pm 9 ms
Dispersion von ARI	18 \pm 2,1 ms
Vektorfeldähnlichkeit (VEC)	56 \pm 2 %
(Ähnlichkeit der Schlag-zu-Schlag Variabilität)	
Erregungsursprungspunkte (BTP)	78 \pm 1 %
(Ähnlichkeit der Schlag-zu-Schlag Variabilität)	
PQ-Zeit	56,2 \pm 1,42 ms
QRS-Dauer	18,1 \pm 3,5 ms
ST-Hebung	160,2 \pm 10 ms
Epikardiale Geschwindigkeit (VEL)	1,45 \pm 0,03 m/s

4.1.2 Wirksamkeit des Ethanol/Wasser-Extrakts

Der Ethanol-Wasser-Extrakt wurde zur Extraktion mittelpolarer und polarer Substanzen angefertigt (s. 3.5.1; s. Abb. 4, 1.) und am isolierten Kaninchenherzen getestet. In dieser Versuchsreihe wurden $n = 3$ Versuche durchgeführt. Es wurden 0,1 mg/ml und 1 mg/ml in das Herz infundiert. Die kardialen Effekte waren überwiegend gering. Der linksventrikuläre Druck (LVP) zeigte bei 0,1 mg/ml eine Abnahme um $14 \pm 15 \%$ und bei 1 mg/ml um $7 \pm 3,6 \%$. Der relative Koronarfluss (rCF) wurde bei 0,1 mg/ml um $35 \pm 32 \%$ und bei 1 mg/ml Extrakt um $33 \pm 2,6 \%$ gesteigert. Die Zykluslänge (BCL) wurde bei 1 mg/ml um $6 \pm 7 \%$ gesteigert. Elektrophysiologisch wurde bei der hohen Extraktkonzentration eine geringgradige Verlängerung der Gesamtaktivierungszeit (TAT) um $1,5 \pm 2,5 \%$ und der lokalen Potentialdauer (ARI) um $5 \pm 6 \%$ bei einer Senkung der Dispersion ($14 \pm 10,2 \%$) verzeichnet. Zusätzlich wurde eine Verlängerung der Wellenlänge um $6 \pm 4 \%$ berechnet. Abb. 12 zeigt die durch den Ethanol/Wasser-Extrakt hervorgerufenen Wirkungen auf die funktionellen Parameter der Herzen. Die PQ-Zeit verlängerte sich um $15 \pm 2 \%$. Die ST-Hebung und die QRS-Dauer wurden nicht beeinflusst. Die Extraktkonzentration 1 mg/ml verminderte die Vektorfeldähnlichkeit (VEC) auf $34 \pm 2,5 \%$ und die BTP-Ähnlichkeit auf $65 \pm 3,7 \%$.

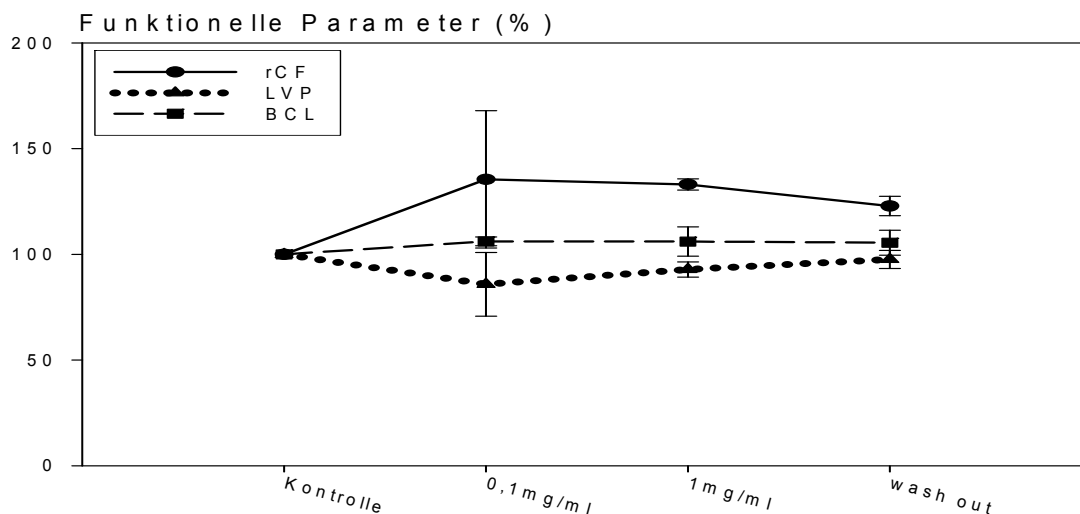


Abb. 12: Die Veränderung der funktionellen Parameter rCF, LVP und BCL durch den Ethanol/Wasser-Extrakt im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

4.1.3 Wirksamkeit des alkalischen Chloroform-Extrakts

Der Chloroform-Extrakt wurde in Konzentrationen von 0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml in das Herz infundiert. Auffällig bei diesen Versuchen waren eine Grauverfärbung des Herzens sowie eine starke, irreversible Vitalitätsminderung bis zum Herzversagen. Insgesamt wurden die

Versuche mit $n = 3$ durchgeführt. Die funktionellen Parameter rCF, BCL und LVP wurden bei 0,2 mg/ml deutlich verändert (s. Abb. 13). Der relative Koronarfluss (rCF) stieg um 60 ± 17 %, die Zykluslänge (BCL) verlängerte sich um 61 ± 30 % und die Kontraktionskraft (LVP) sank um 44 ± 5 %. Die elektrophysiologischen Parameter wiesen ebenfalls eine deutliche Veränderung bei der hohen Konzentration auf. Sowohl die PQ-Zeit (+12 %) als auch die ST-Hebung (+22 %) wurden erhöht (s. Anhang 2, Abb. 1). Die Dauer des QRS-Komplexes verlängerte sich um 30 % und bei Betrachtung der vier Herzareale waren die linke und hintere Herzwand am stärksten betroffen. Die Vektorfeldähnlichkeit (VEC) wurde bei 0,1 mg/ml um 62 ± 10 % und bei 0,2 mg/ml um 76 ± 6 % verringert. Die Erregungsursprungspunkte (BTP) zeigten eine Verminderung der Ähnlichkeit um 37 ± 3 %. Außerdem wurde die Gesamtaktivierungszeit (TAT) um 15 % und die lokale Potentialdauer (ARI) um 14 % verzögert. Die Dispersion von ARI wurde um 63 % erhöht (s. Anhang 2, Abb.2). Die Wellenlänge blieb unbeeinflusst. Die Veränderungen aller Parameter waren nach der Auswaschung nicht reversibel, sondern nahmen an Intensität zu.

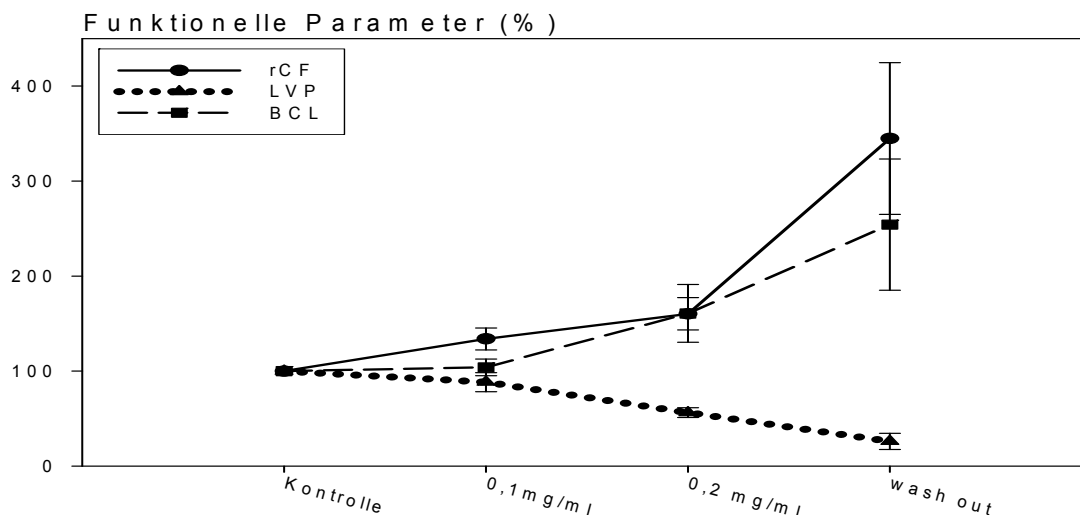


Abb.13: Die funktionellen Parameter rCF, LVP und BCL unter Einwirkung des Chloroform-Extrakts im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

4.1.4 Wirksamkeit des Soxhlet-Extrakts

In dieser Versuchsreihe wurde der Soxhlet-Extrakt in ansteigenden Konzentrationen (0,1 mg/ml und 1 mg/ml) in das Kaninchenherz infundiert. Es zeigte sich eine Veränderung der funktionellen Parameter LVP, rCF und BCL (s. 3.9.3.2). Da bei 1 mg/ml Extrakt die kardialen Auswirkungen am prägnantesten waren, sind die im Folgenden aufgeführten Werte auf diese Extraktkonzentration zurückzuführen. Insgesamt wurden die Versuche mit $n = 6$ durchgeführt. Der linksventrikuläre Druck (LVP) verringerte sich während der Extraktinfusion auf 24 ± 9 %. Der relative Koronarfluss (rCF) verstärkte sich im Versuchsverlauf um 69 ± 20 %.

% . Eine Verlangsamung der basalen Zykluslänge (BCL) um 29 ± 13 % wurde verzeichnet. Abb. 14 zeigt die Auswirkungen des Soxhlet-Extrakts auf die funktionellen Parameter des Herzens. Die ST-Hebung zur Erfassung der Plateauphase wurde durch den Soxhlet-Extrakt um 13 ± 4 % erhöht (s. Anhang 2 Abb. 3). Die PQ-Zeit (Kontrolle: $56,18 \pm 4$ ms; 1 mg/ml: $55,8 \pm 6$ ms) und QRS (Kontrolle: $35,16 \pm 0,8$ ms; 1 mg/ml: $36,59 \pm 1,1$ ms) blieben nahezu unbeeinflusst. Elektrophysiologisch wurde eine Verlängerung der Gesamtaktivierungszeit (TAT) (s. Anhang 2, Abb. 4 A), welche ein Maß für die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung darstellt, um $12 \pm 6,1$ % beobachtet. Die lokale Potentialdauer (ARI) verlängerte sich durch den Soxhlet-Extrakt um $26 \pm 10,4$ %, bei einer gleichzeitigen Verminderung der Dispersion um 23 % (s. Anhang 2, Abb. 4 B). Die Veränderungen der Dispersion von ARI wurden in allen vier Herzarealen berechnet, um regionale Unterschiede im Herzen feststellen zu können. Die rechte Herzwand wies unter Extrakteinfluss eine Verminderung der Dispersion von ARI um 7 %, die linke um 5 % und die hintere Herzwand um 17 % auf. An der vorderen Herzwand war eine minimale Zunahme der Dispersion um 1 % zu verzeichnen.

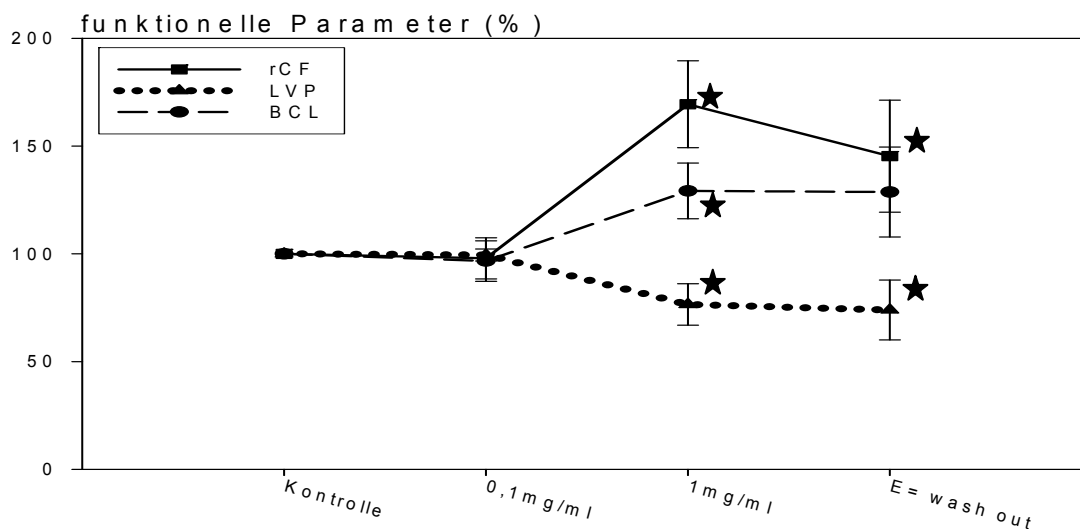


Abb. 14: Die funktionellen Parameter rCF, LVP und BCL unter Einwirkung des Soxhlet-Extrakts im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollwerten sind durch einen ★ gekennzeichnet.

Um die Verlängerung des Aktionspotentials Frequenz-unabhängig zu betrachten, wird QTc ermittelt [$QTc = (ARI/1000)/(\sqrt{BCL/1000})$]. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Potentialdauer verschiedener Herzen, da die unterschiedlichen Frequenzen der einzelnen Herzen dadurch berücksichtigt und vereinheitlicht werden. Der Soxhlet-Extrakt verlängerte das Aktionspotential unabhängig von der Frequenz um 8 ± 4 % (s. Anhang 2, Abb. 4 C). Zur Erfassung der Veränderung der Erregungsausbreitungswelle wurde die Wellenlänge aus

dem Produkt der lokalen Potentialdauer (ARI) und der epikardialen Geschwindigkeit (VEL) errechnet. VEL ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung. Dabei wurde unter Extrakteinfluss die Wellenlänge um $24 \pm 10 \%$ verlängert. Der Soxhlet-Extrakt führte zu einer Verminderung der Vektorfeldähnlichkeit (VEC) um $69 \pm 2,4 \%$ und der Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte um $39 \pm 1,1 \%$.

4.1.5 Wirkung des Soxhlet-Extrakts unter „Low- Ca^{2+} “-Tyrode

Im zeitlichen Verlauf nimmt physiologisch bei einem isolierten Herzen die Kontraktionskraft ab. Der linksventrikuläre Druck blieb während der Infusion des Soxhlet-Extrakts mit $0,1 \text{ mg/ml}$ jedoch mit $99 \pm 4 \%$ fast konstant (s. Abb. 15). Um eine möglicherweise positiv inotrope Wirkung des Extrakts zu verdeutlichen, wurde in dieser Versuchsserie mit einer Tyrode-Lösung gearbeitet, die eine geringere Kalzium-Konzentration ($0,9 \text{ mmol/l}$) als in den übrigen Versuchen ($1,8 \text{ mmol/l}$) aufwies. Eine Verstärkung der positiven Inotropie wurde jedoch nicht deutlich. Insgesamt wurden $n = 3$ Versuche durchgeführt.

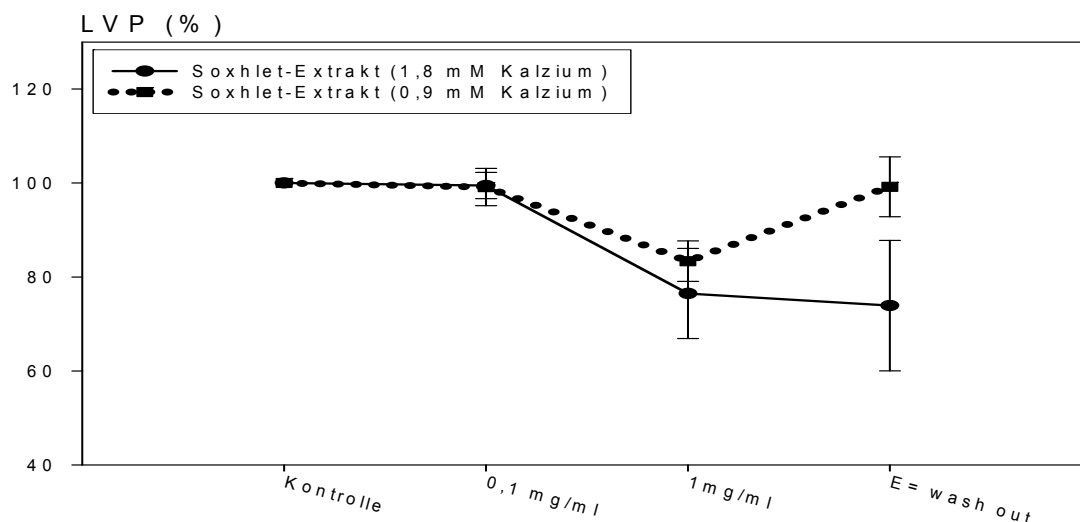


Abb. 15: Vergleich des Soxhlet-Extrakts bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen der Tyrode-Lösung im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

4.1.6 Wirkungen der Ausschüttungen des Soxhlet-Extrakts

Da der Soxhlet-Extrakt eine potentiell antiarrhythmische Wirkung am Herzen aufwies, wurde er fraktioniert, um so die wirksamen Komponenten eingrenzen zu können (s. Abb. 4, 2.).

4.1.6.1 Wirkungen der Ethylazetatfraktion

Durch die Ausschüttung des Soxhlet-Extrakts mit Ethylazetat reicherten sich lipophile Stoffe in der Ethylazetatfraktion an und stellten einen Anteil am Gesamtextrakt (Soxhlet-Extrakt) dar (s. 3.6.4). In dieser Versuchsserie wurde die Ethylazetatfraktion in den Konzentrationen

0,00182 mg/ml (= 0,1 mg/ml Soxhlet-Extrakt) und 0,0182 mg/ml (= 1 mg/ml Soxhlet-Extrakt) infundiert. Insgesamt wurden $n = 3$ Versuche durchgeführt. Sowohl die funktionellen (s. Abb. 16) als auch die elektrophysiologischen Parameter wiesen in der hohen Extraktkonzentration nur geringe Veränderungen auf. Der linksventrikuläre Druck (LVP) wurde um $12 \pm 4,8 \%$ verringert. Der relative Koronarfluss (rCF) wurde um $11 \pm 13 \%$ erhöht. Die basale Zykluslänge (BCL) blieb mit $99,85 \pm 7 \%$ nahezu konstant.

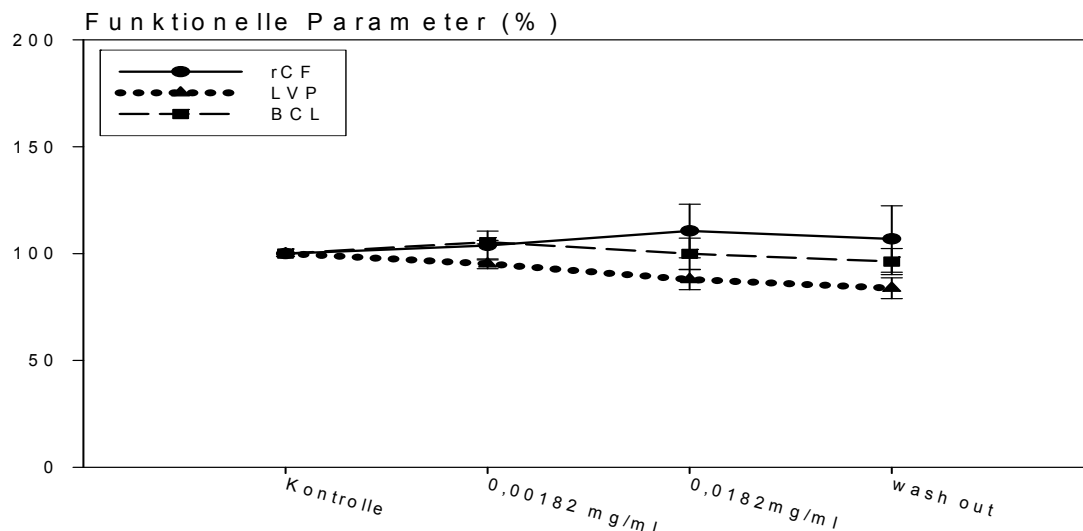


Abb. 16: Veränderungen der funktionellen Parameter rCF, LVP und BCL durch die Ethylazetatfraktion im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

Sowohl die PQ-Zeit als auch die QRS-Dauer und die ST-Hebung blieben ebenso wie die Wellenlänge unverändert. Die Gesamtaktivierungszeit (TAT) veränderte sich mit -4% und die lokale Potentialdauer (ARI) mit -2% nicht. Die Dispersion von ARI wurde um $12 \pm 7,5 \%$ vermindert. Die Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte (BTP) minimierte sich um $34 \pm 6,3 \%$ und die Vektorfeldähnlichkeit sank um $67 \pm 5,5 \%$. Die Chloroformfraktion wurde nicht getestet, da auf Grund der Lipophilie in der Ethylazetatfraktion überwiegend gleiche Pflanzeninhaltsstoffe enthalten sind und die Ethylazetatfraktion nur minimale Wirkungen am Herzen zeigte.

4.1.6.2 Wirkungen der wässrigen Fraktion

Nach der Ausschüttlung mit Ethylazetat blieb eine wässrige Fraktion übrig (s. 3.6.1), die eine weitere Fraktion der Inhaltsstoffe des Soxhlet-Extrakts darstellt. Die wässrige Fraktion des Soxhlet-Extrakts wurde in den Konzentrationen 0,0959 mg/ml (= 0,1 mg/ml Soxhlet-Extrakt), 0,479 mg/ml (= 0,5 mg/ml Soxhlet-Extrakt) und 0,959 mg/ml (= 1 mg/ml) an $n = 6$ Versuchen am Herzen getestet. Auffällig bei diesen Versuchen war eine Dissoziation des Aktionspotentials, d.h. alle vier Herzareale zeigten zeitlich kein einheitliches Aktionspotential. Alle Veränderungen der funktionellen Parameter waren reversibel (s. Abb. 17). Die

Veränderungen waren dosisabhängig und werden im Folgenden angegeben. Durch die wässrige Fraktion wurde der linksventrikuläre Druck (LVP) um 77 ± 13 % verringert, der relative Koronarfluss (rCF) um 80 ± 31 % erhöht und die Zykluslänge (BCL) um 95 ± 27 % verlängert.

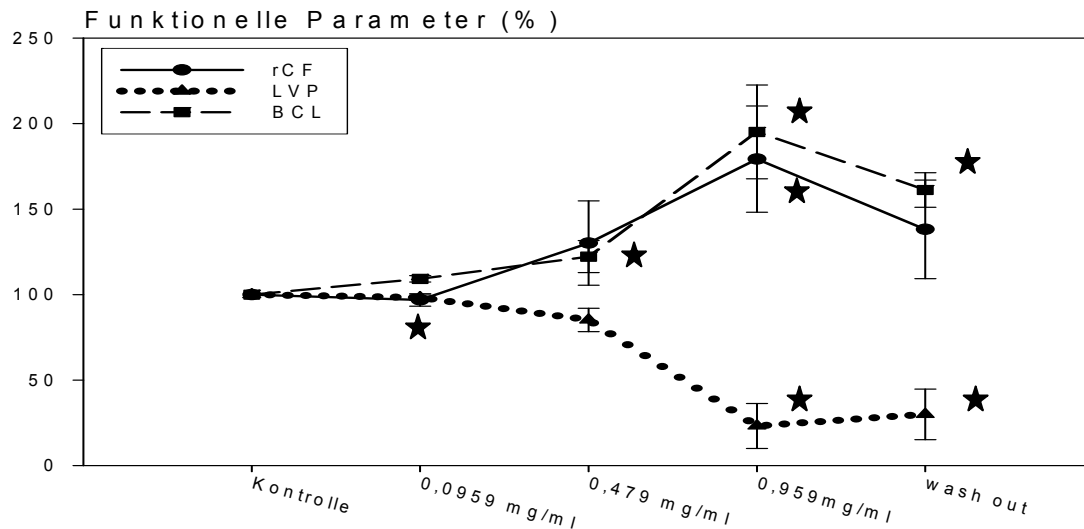


Abb. 17: Veränderungen der funktionellen Parameter unter dem Einfluss der wässrigen Fraktion im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

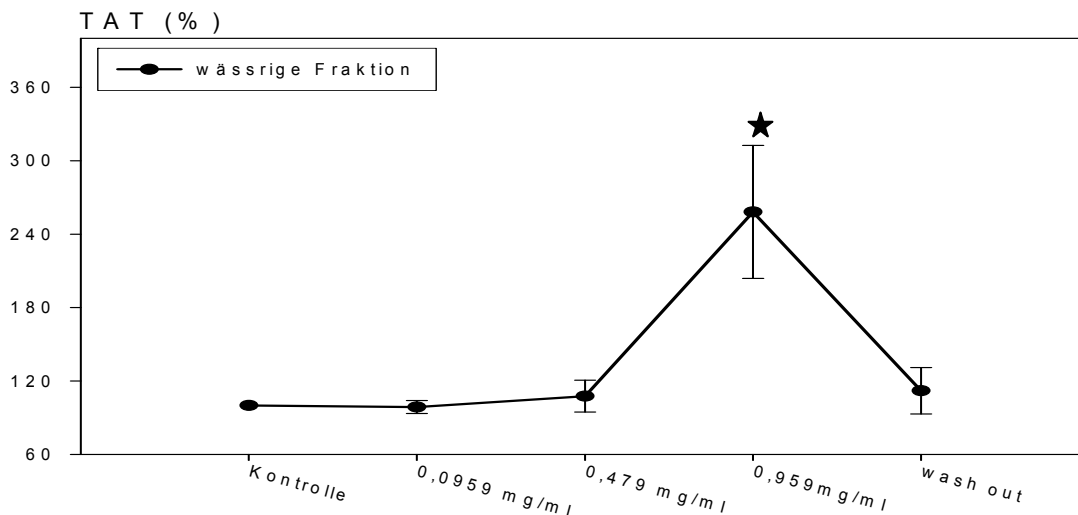


Abb. 18: Verlängerung der Gesamtaktivierungszeit durch die wässrige Fraktion des Soxhlet-Extrakts im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

Elektrophysiologisch wurde bei der ST-Hebung eine Erhöhung um 37 ± 10 % verzeichnet (s. Anhang 2, Abb. 5). Die PQ-Zeit verlängerte sich um 34 ± 29 % und der QRS-Komplex wurde um 76 ± 24 % ausgedehnt (s. Anhang 2, Abb. 6). Die wässrige Fraktion des Soxhlet-Extrakts

bewirkte eine massive Verlängerung der Gesamtaktivierungszeit (TAT) um 158 ± 54 % (s. Abb. 18). Es konnten ebenfalls ausgeprägte Potentialverlängerungen (ARI) um 35 ± 14 % bei einer Erhöhung der Dispersion um 42 ± 14 % registriert werden (s. Anhang 2, Abb. 7). QTc verlängerte sich bei der Extraktkonzentration von 0,479 mg/ml um 8 ± 3 %. Bei der höchsten Konzentration näherte sich QTc den Kontrollwerten (s. Anhang 2, Abb. 8). Die epikardiale Geschwindigkeit (VEL) verlangsamte sich um 27 ± 7 % (s. Anhang 2, Abb. 9). Bei Betrachtung der vier Herzareale wirkte sich der Extrakt überwiegend auf die Geschwindigkeit in der vorderen (-40 %), linken (-25 %) und hinteren (-37 %) Herzwand aus. Die epikardiale Geschwindigkeit der rechten Herzwand blieb im Vergleich zur Kontrolle konstant (s. Anhang 2, Abb. 10). Die Wellenlänge wurde dagegen nicht beeinflusst. Sowohl die Vektorfeldähnlichkeit (VEC) als auch die Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte (BTP) wurden unter Fraktionseinwirkung prägnant um 80 ± 4 % und 38 ± 4 % vermindert (s. Anhang 2, Abb. 11).

4.1.7 Präzipitation der wässrigen Fraktion mit Methanol

Nach der Ausschüttlung des Soxhlet-Extrakts mit Ethylazetat und Chloroform wurde am isolierten Herzen festgestellt, dass der zuvor durch den Soxhlet-Extrakt bewirkte kardiale Effekt nun in der ausgeschüttelten, wässrigen Fraktion wiederzufinden war. Als weiterer Fraktionierungsschritt wurde deshalb die ausgeschüttelte, wässrige Fraktion mit Methanol versetzt (s. Abb. 4, 3.).

4.1.7.1 Wirkungen des Präzipitats

Alle Methanol-unlöslichen Pflanzeninhaltsstoffe wurden durch die Vermischung der wässrigen Fraktion mit Methanol ausgefällt (s. 3.6.2). In dieser Versuchsreihe mit $n = 3$ wurden verschiedene Fraktionskonzentrationen eingesetzt: 0,016 mg/ml (= 0,1 mg/ml Soxhlet-Extrakt), 0,16 mg/ml (= 1 mg/ml Soxhlet-Extrakt) und 0,48 mg/ml (= 3 mg/ml Soxhlet-Extrakt). Sowohl die funktionellen als auch die elektrophysiologischen Parameter zeigten bis auf die Gesamtaktivierungszeit (TAT) irreversible Veränderungen. Die im Folgenden angegebenen Werte beziehen sich auf die höchste Konzentration. Der linksventrikuläre Druck (LVP) wurde um 71 ± 4 % verringert und sowohl der relative Koronarfluss als auch die Zykluslänge wurden um 83 ± 1 % bzw. 81 ± 22 % erhöht (s. Abb. 19). Das PQ-Intervall zeigte einen Anstieg von 44 ± 32 % und einen ST-Anstieg um 47 ± 11 %. Der QRS-Komplex wurde um 65 ± 13 % ausgedehnt (s. Anhang 2, Abb. 13). Die einzige reversible Veränderung am Herzen äußerte sich in der Gesamtaktivierungszeit (TAT), die unter Fraktionseinfluss eine Verlängerung von 192 ± 50 % aufwies. Eine Zunahme der lokalen Aktionspotentialdauer (ARI) um 43 ± 10 % sowie der Dispersion um 269 ± 54 % wurde registriert. QTc zeigte mit 8 ± 8 % nur kaum eine Frequenz-unabhängige Verlängerung des Aktionspotentials. Eine

Auswirkung auf die Wellenlänge mit $-5 \pm 5 \%$ war nicht gegeben. Die Vektorfeldähnlichkeit wurde um $83 \pm 2 \%$ und die BTP-Ähnlichkeit um $39 \pm 5 \%$ dezimiert. Die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung (VEL) wurde um $39 \pm 2 \%$ verringert (s. Anhang 2, Abb. 14).

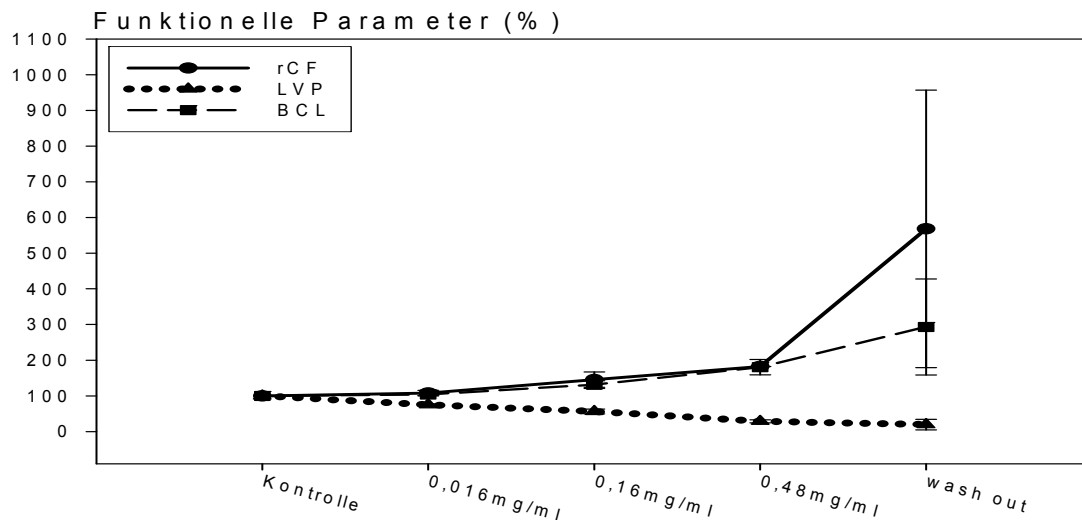


Abb. 19: Der Einfluss des Methanolpräzipitats auf die funktionellen Parameter rCF, LVP und BCL im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

4.1.7.2 Wirkung der Methanol-löslichen Fraktion

Diese Fraktion beinhaltet nur die Stoffe der wässrigen Fraktion, die in Methanol löslich waren (s. Abb. 4, 3.). Insgesamt wurden $n = 6$ Versuche durchgeführt, wobei eine Dosis-Wirkungskurve mit folgenden Konzentrationen durchgeführt wurde: 0,0719 mg/ml (= 0,1 mg/ml Soxhlet-Extrakt), 0,719 mg/ml (= 1 mg/ml Soxhlet-Extrakt), 2,16 mg/ml (= 3 mg/ml Soxhlet-Extrakt) und 3,59 mg/ml (= 5 mg/ml Soxhlet-Extrakt). Als charakteristisch für diese Versuchreihe zeigte sich die vollständige Reversibilität der funktionellen und elektrophysiologischen Parameter. Mit der höchsten Konzentration konnte bei $n = 4$ Versuchen ein Herzstillstand mit einer aufrecht erhaltenen Koronarzirkulation erzeugt werden. Während des wash out entwickelte das Herz wieder einen stabilen Sinusrhythmus (s. Abb. 20). Bei 2 Herzen konnte kein Herzstillstand erzeugt werden. Dies ermöglichte die Bestimmung des linksventrikulären Drucks (LVP), der basalen Zykluslänge (BCL) und des relativen Koronarflusses (rCF) (s. Abb. 21) unter der höchsten Konzentration. Die im Folgenden genannten funktionellen Parameter beziehen sich auf die höchste Konzentration und die elektrophysiologischen Parameter auf 2,16 mg/ml Methanol-lösliche Fraktion, da bei der Auswertung der höchsten Konzentration einige Parameter auf Grund des Herzstillstands nicht erstellt werden konnten. Der linksventrikuläre Druck (LVP) wurde um $65 \pm 23 \%$ verringert. Des Weiteren wurde die Zykluslänge (BCL) um 870 % verlangsamt und der relative Koronarfluss (rCF) um 152 % erhöht. Elektrophysiologisch wurde eine Verlängerung der PQ-Zeit um $24 \pm 6 \%$ und eine Erhöhung der ST-Hebung um $12 \pm 6 \%$ verzeichnet (s. Anhang 2, Abb. 15).

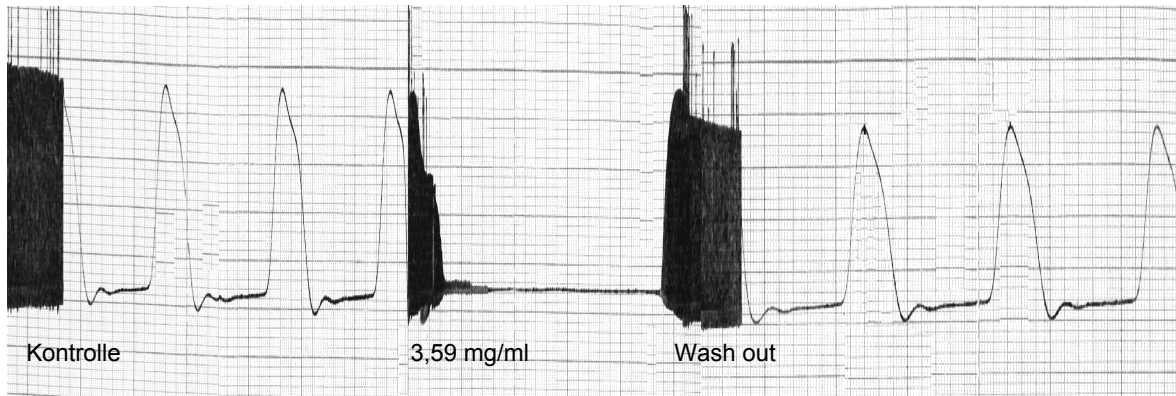


Abb. 20: Der in den linken Ventrikel eingeführte Ballon ermöglichte die Darstellung der Kontraktionskraft im Versuchsverlauf von der Kontrolle, 3,59 mg/ml Methanol-löslicher Fraktion und nach dem wash out (s. 3.9.2.5).

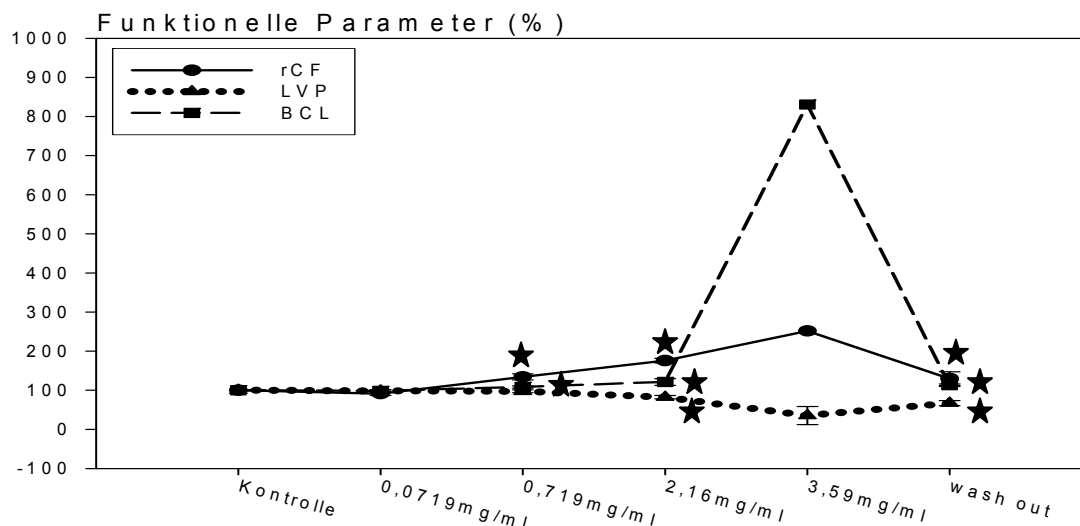


Abb. 21: Darstellung der Effekte der Methanol-löslichen Fraktion auf die funktionellen Parameter rCF, LVP und BCL im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

Bei 2,16 mg/ml wurde die Gesamtaktivierungszeit um 81 ± 37 % und bei 3,59 mg/ml massiv um 1068 % verlangsamt (s. Abb. 22). Dabei wurde regional überwiegend die hintere Herzwand verlangsamt. Die lokale Potentialdauer (ARI) nahm um 16 ± 5 % zu. Unter dem Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion wurde die Frequenz-normalisierte Potentialdauer mit $+4 \pm 4$ % nicht beeinflusst. Die Dispersion von ARI nahm um 51 ± 8 % ab (s. Abb. 23). Am stärksten betroffen waren die vordere Herzwand mit einer Verminderung der Dispersion um 72 % und die hintere Herzwand mit 18 %. Die Dispersion der linken Herzwand blieb im Vergleich zur Kontrolle mit -2 % konstant. Ein Anstieg der Dispersion konnte auf der rechten Herzwand mit 14 % registriert werden (s. Anhang 2, Abb. 16). Trotz einer Verminderung der

epikardialen Geschwindigkeit (VEL) um 45 ± 4 % wurde die Wellenlänge des kardialen Impulses nicht beeinflusst. Die Ähnlichkeit des Vektorfelds (VEC) und der Erregungsursprungspunkte (BTP) sanken um 74 ± 4 % bzw. 42 ± 3 % (s. Anhang 2, Abb. 17).

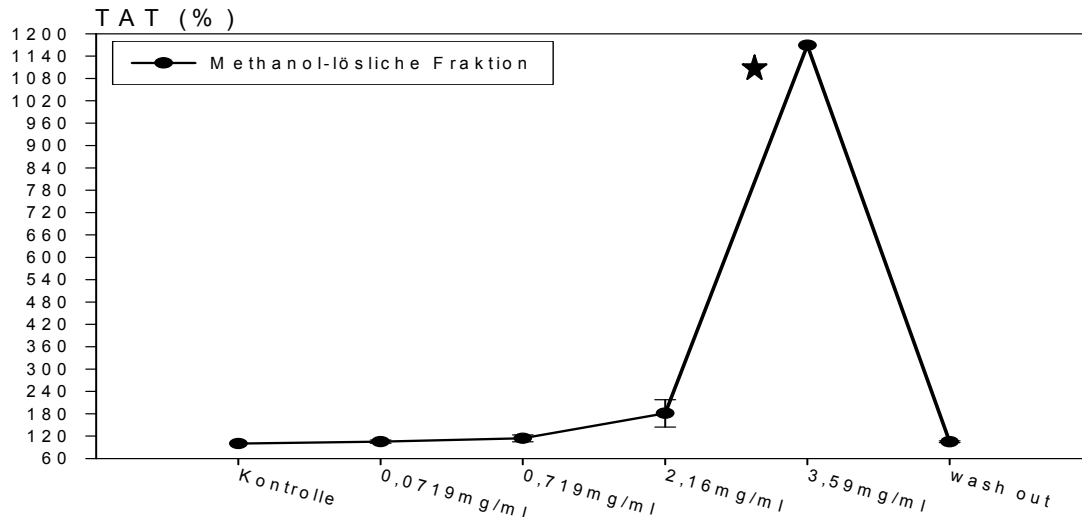


Abb. 22: Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion auf die Gesamtaktivierungszeit (TAT) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollwerten sind mit einem ★ gekennzeichnet.

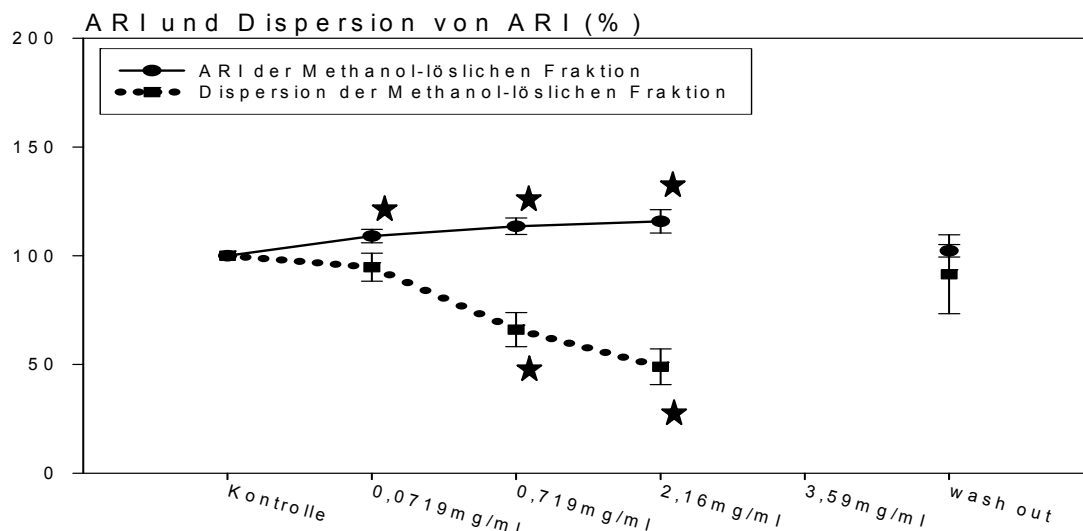


Abb. 23: ARI und Dispersion von ARI beeinflusst durch die Methanol-lösliche Fraktion im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollwerten sind mit einem ★ gekennzeichnet.

Der Kalium-Gehalt der Methanol-löslichen Fraktion wurde zeitlich nach den In-vivo - Versuchen reduziert, da in den Versuchen am lebenden Tiermodell festgestellt wurde, dass die Methanol-lösliche Fraktion eine hohe Kalium-Konzentration enthielt (s. 3.6.3).

Deshalb werden die Wirkungen der an Kalium reduzierten Methanol-löslichen Fraktion nach der Vorstellung der Ergebnisse der In-vivo -Versuche aufgeführt. Die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit (VEL) im Herzen wurde um $45 \pm 4 \%$ vermindert (s. Anhang 2, Abb. 18).

4.2 In-vitro -Versuche – Wirkungen des Extraktes im Arrhythmie-Modell

Um die Wirkungsbreite der Methanol-löslichen Fraktion zu untersuchen, wurden drei Arrhythmie-Modelle am isolierten Herzen mit $n = 6$ durchgeführt. Sämtliche Werte werden als $MW \pm SEM$ angegeben. Die Referenzsubstanzen bei der elektrischen Stimulation wurden mit $n = 2$ veranschlagt.

4.2.1 Elektrische Stimulation

Mittels der elektrischen Stimulation lassen sich Reizschwellen und deren Verschiebung unter Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion ermitteln. Die Reizschwelle gibt die Schwelle an, ab der im Herzen eine Arrhythmie ausgelöst werden kann. Dadurch können bei der Methanol-löslichen Fraktion antiarrhythmische, d.h. eine Hebung der Reizschwelle, oder proarrhythmische Wirkungen, d.h. eine Senkung der Reizschwelle, registriert werden. Diese Versuchsreihe diente der Ermittlung prophylaktischer Eigenschaften der Methanol-löslichen Fraktion sowie der Berechnung longitudinaler und transversaler Leitungsgeschwindigkeiten im Herzen anhand von Aktivierungsmustern. Um die im Herzen fließende Stromstärke zu charakterisieren, wurde über ein Oszilloskop der Spannungsabfall am Herzen gemessen. Ein Stimulus von 1 V, der bei einem Widerstand von 1 k Ω angelegt wurde, ergab eine Stromstärke im Herzen von 0,2 mA.

4.2.1.1 Wirkungen der Methanol-löslichen Fraktion

Die Reizschwellenverschiebung durch die Methanol-lösliche Fraktion wurde in den Konzentrationen 2,16 mg/ml und 3,59 mg/ml getestet und mit Kontroll- und wash out-Werten verglichen. Durchschnittlich lag die Schwelle zur Arrhythmieauslösung während Kontrollbedingungen bei $1,13 \pm 0,3$ V. Somit durchlief eine Stromstärke von 0,23 mA das Herz. Bei einer Konzentration von 2,16 mg/ml der Methanol-löslichen Fraktion waren 3,8 V nötig, um eine Arrhythmie auszulösen (= 0,76 mA). Die höhere Konzentration von 3,59 mg/ml, durch die ein Herzstillstand erzeugt werden konnte, erforderte für das Auslösen einer Arrhythmie eine Spannung von $9,9 \pm 3$ V (= 1,98 mA) (s. Abb. 24). Das entspricht einer Reizschwellenverschiebung bei einer Fraktionskonzentration von 3,59 mg/ml um 1172 %. Eine Verringerung der Spannung konnte im wash out mit $1,4 \pm 0,4$ V (= 0,28 mA) verzeichnet werden. Überdies wurde das Herz durch die elektrische Stimulation epikardial aktiviert. Das

Ausbreitungsmuster der Aktivierung ermöglichte die Bestimmung der longitudinalen und transversalen Leitungsgeschwindigkeit anhand von Isochronen sowie deren Veränderung

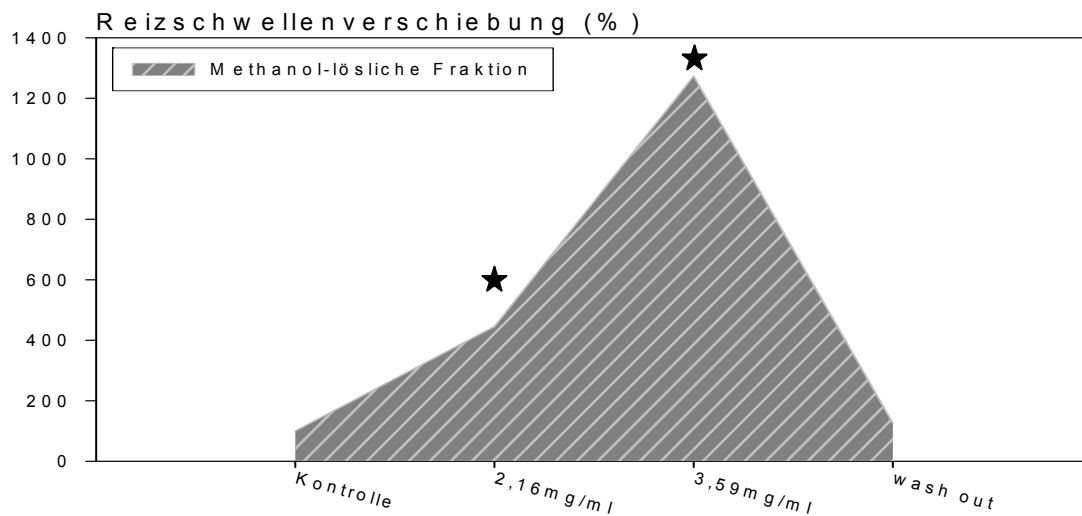
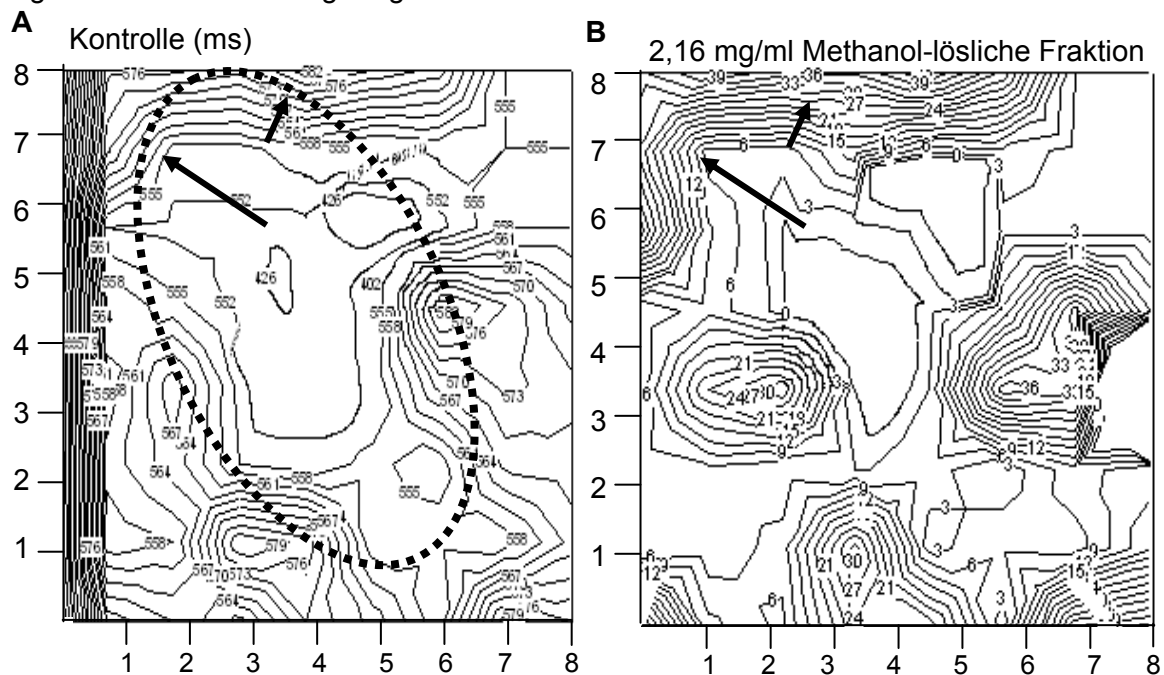


Abb. 24: Reizschwellenverschiebung durch den Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

unter Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion (s. 2.4.2.3). Eine Veränderung der Isochronenmuster im Vergleich zu Kontrollbedingungen ist unter Einwirkung der Methanol-löslichen Fraktion deutlich (s. Abb. 25). Die Auswertung der Aktivierungsmuster war bei der höchsten Fraktionskonzentration nicht möglich, da die Amplituden auf Grund ihrer Höhe vom Programm nicht vollständig dargestellt werden konnten.



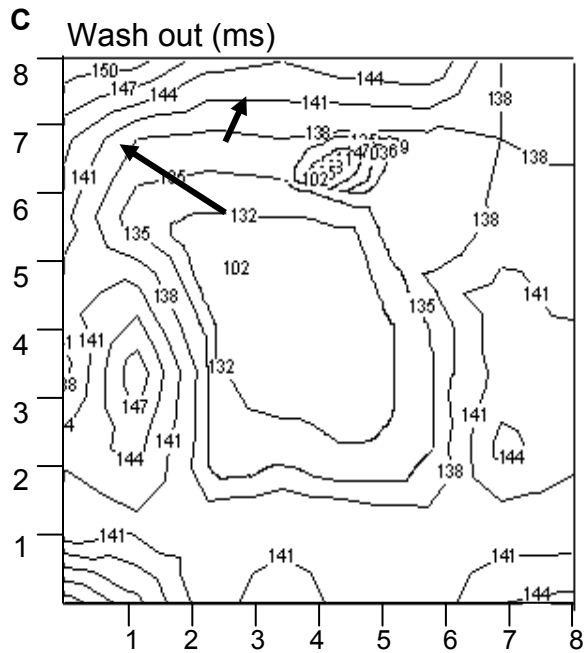


Abb. 25:

Repräsentative Darstellung der Isochronmuster an einem isolierten Herzen unter Kontrollbedingungen (A), 2,16 mg/ml Methanol-lösliche Fraktion (B) und wash out (C). Der große Pfeil weist auf die longitudinale Erregungsausbreitung und der kleine Pfeil auf die transversale. Eine ellipsoide Achse ist unter Kontrollbedingungen zur Verdeutlichung der Herzachse eingezeichnet (gepunktet). Bei den Abbildungen (A, B, C) ist jede dritte Isochronlinie zu sehen. Je kleiner der Abstand zwischen den Isochronen unter der Fraktion im Vergleich zur Kontrolle wird (B), desto langsamer wird die Leitungsgeschwindigkeit. Beim wash out (C) ist umgekehrt ein größerer Isochronabstand sichtbar.

Deshalb beziehen sich die folgenden Werte auf 2,16 mg/ml Methanol-lösliche Fraktion. Aus den Isochronmustern wurden die Leitungsgeschwindigkeiten im Herzen bestimmt. Die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit wurde durch diese Fraktion um $73 \pm 7 \%$ und die transversale Leitungsgeschwindigkeit um $63 \pm 17 \%$ verlangsamt (s. Abb. 26).

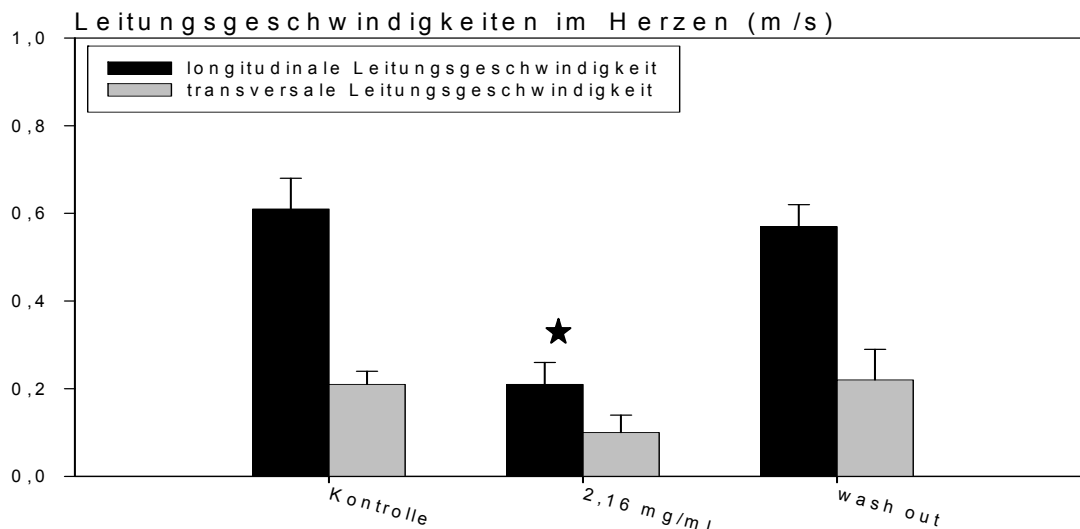


Abb. 26: Beeinflussung der transversalen und longitudinalen Leitungsgeschwindigkeit durch die Methanol-lösliche Fraktion im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

4.2.1.2 Referenzsubstanzen

Der Na^{2+} -Kanal-Blocker Ajmalin und der Gap Junction-Blocker Palmitoleinsäure wurden als Referenzsubstanzen für die Methanol-lösliche Fraktion gewählt. In den Versuchen wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: Ajmalin $1 \mu\text{mol/l}$ und Palmitoleinsäure $10 \mu\text{mol/l}$. Unter Kontrollbedingungen war eine Spannung von durchschnittlich $0,4 \text{ V}$ ($= 0,08 \text{ A}$) nötig, um eine Arrhythmie auszulösen und unter $1 \mu\text{mol/l}$ Ajmalin war eine durchschnittliche Spannung von $0,8 \text{ V}$ ($= 0,16 \text{ mA}$) dafür erforderlich. Dadurch wurde die Reizschwelle durch den Einfluss von Ajmalin um das Doppelte erhöht (s. Abb. 27, s. Anhang 2, Abb. 19). Bei der Palmitoleinsäure war unter Kontrollbedingungen eine Spannung von durchschnittlich $0,48 \text{ V}$ ($= 0,1 \text{ mA}$) zur Arrhythmieauslösung erforderlich und verschob sich bei der Gabe von Palmitoleinsäure auf durchschnittlich $0,45 \text{ V}$ ($= 0,09 \text{ mA}$). Die Reizschwelle des Herzens blieb unter dem Gap Junction-Blocker mit -4% nahezu konstant (s. Abb. 27, S. Anhang 2, Abb. 19).

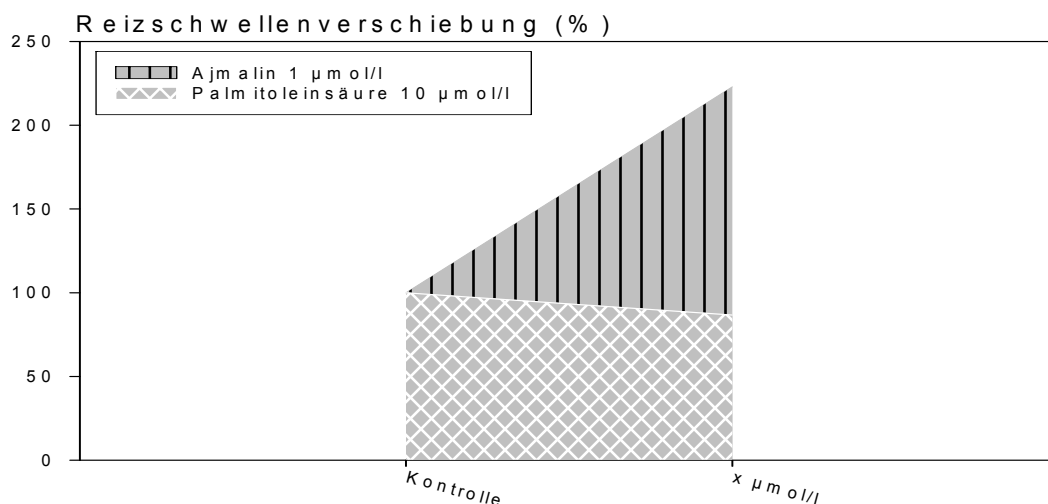


Abb. 27: Reizschwellenveränderung durch den Einfluss von Ajmalin und Palmitoleinsäure. X $\mu\text{mol/l}$ entsprechen $1 \mu\text{mol/l}$ Ajmalin bzw. $10 \mu\text{mol/l}$ Palmitoleinsäure.

Ajmalin verlangsamte die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit um 64% und die transversale um 40% . Dagegen blieb die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit durch die Palmitoleinsäure beinahe konstant und die transversale Geschwindigkeit wurde um 35% herabgesetzt. Die Verlangsamung der longitudinalen Leitungsgeschwindigkeit durch Ajmalin (s. Abb. 28) und der transversalen durch die Palmitoleinsäure (s. Abb. 29) konnte anhand von Isochronmuster veranschaulicht werden.

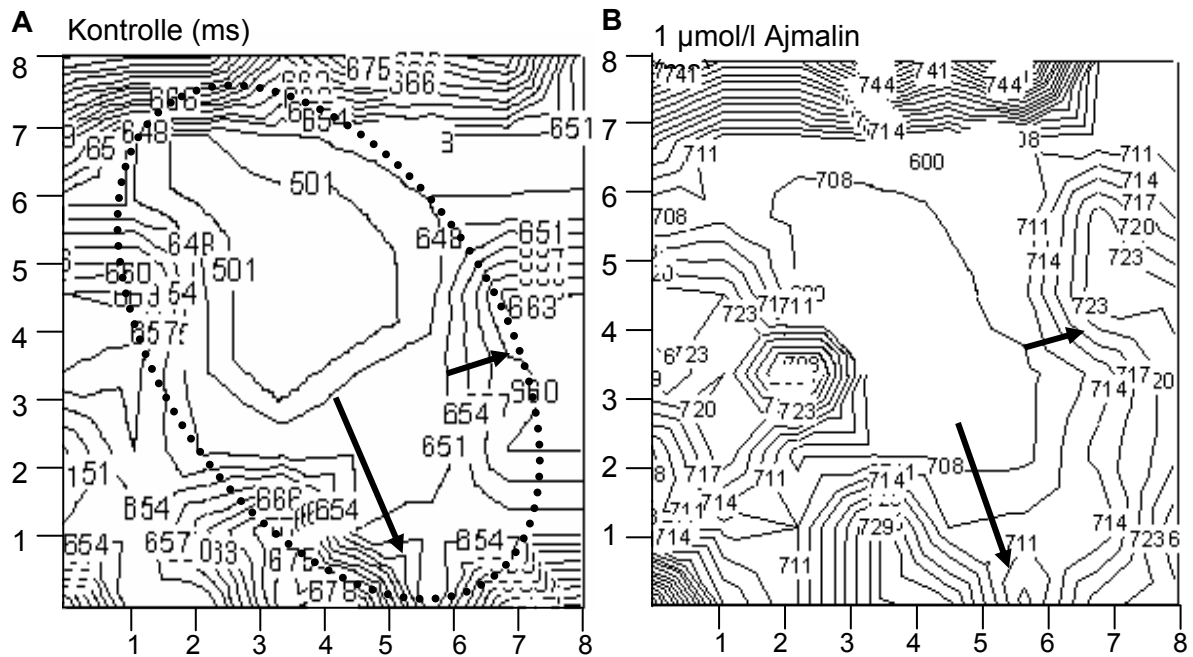


Abb. 28: Repräsentative Darstellung der Veränderung der Isochronenmuster durch den Einfluss von 1 µmol/l Ajmalin (B) im Vergleich zur Kontrolle (A). Der große Pfeil zeigt die longitudinale Erregungsausbreitung und der kleine Pfeil die transversale. Die gepunktete Ellipse verdeutlicht die Achse des Herzens. Jede dritte Isochronenlinie ist bei beiden Abbildungen (A, B) zusehen. Je kleiner der Abstand zwischen den Isochronen unter Ajmalin im Vergleich zur Kontrolle wird, desto langsamer wird die Leitungsgeschwindigkeit.

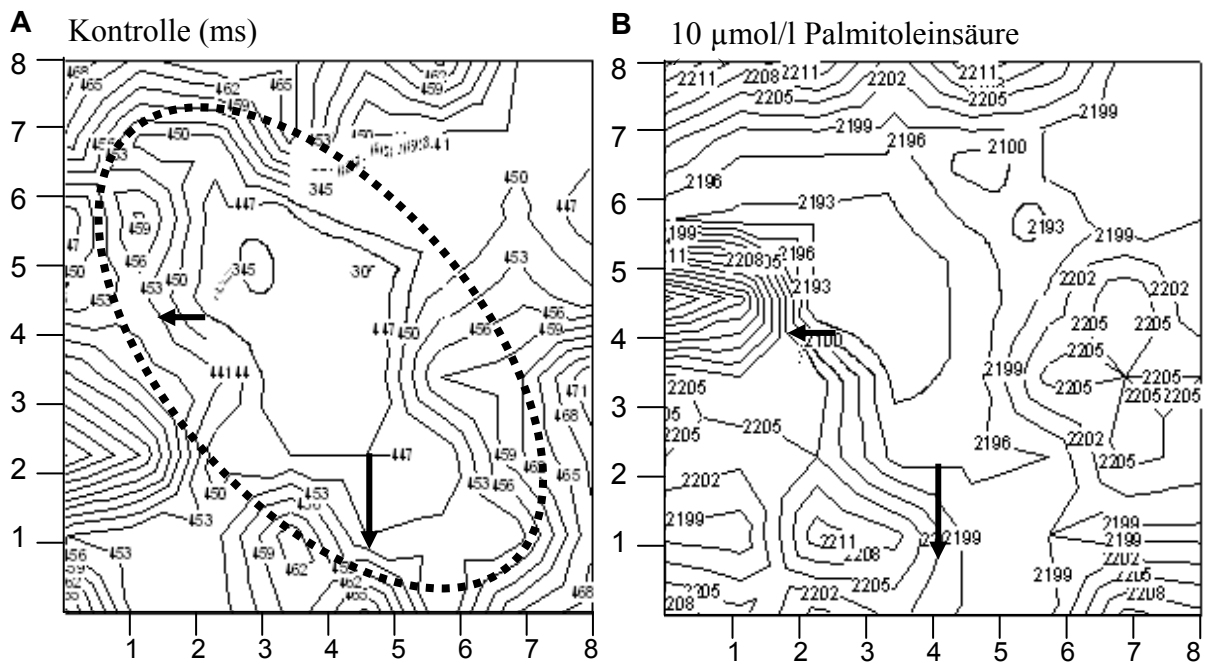


Abb. 29: Durch den Einfluss von 10 µmol/l Palmitoleinsäure (B) veränderte sich das Isochronenmuster im Vergleich zur Kontrolle (A). (Beschreibung siehe Abb. 28)

4.2.1.3 Vergleich der Methanol-löslichen Fraktion mit den Referenzsubstanzen

Die Methanol-lösliche Fraktion verlangsamte die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit um 9 % stärker als Ajmalin, wogegen Ajmalin die transversale Leitungsgeschwindigkeit um 17 % stärker herabsetzte als die Fraktion. Die Palmitoleinsäure als Gap Junction-Blocker reduzierte die transversale Leitungsgeschwindigkeit im Herzen (DHEIN et al. 1999) im Vergleich zur Methanol-löslichen Fraktion um 19 % kräftiger. Ajmalin senkte longitudinal die Geschwindigkeit um 60 % stärker und transversal die Geschwindigkeit um 4 % weniger als die Palmitoleinsäure (s. Abb. 30).

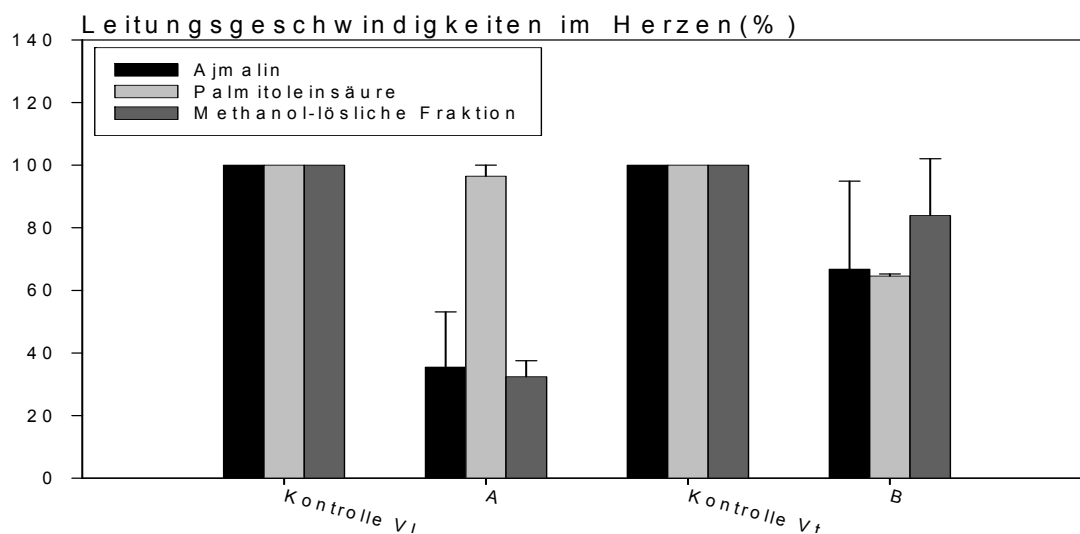


Abb. 30: Die Auswirkungen auf die longitudinale und transversale Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit durch den Methanol-Extrakt. Die Referenzsubstanzen Ajmalin und Palmitoleinsäure werden vergleichend dargestellt im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). V_l = longitudinale Leitungsgeschwindigkeit; V_t = transversale Leitungsgeschwindigkeit; A und B = 2,16 mg/ml Methanol-lösliche Fraktion, 1 μ mol/l Ajmalin, 10 μ mol/l Palmitoleinsäure.

Die Reizschwelle des Herzens, oberhalb derer Arrhythmien ausgelöst werden können, wurde durch die Methanol-lösliche Fraktion und Ajmalin deutlich verändert. Die Palmitoleinsäure wies keinen nennenswerten Effekt auf (s. 2.4.2.4.1 u. 2.4.2.4.2). Die Methanol-lösliche Fraktion verschoob die Reizschwelle um 1000 % höher als das Ajmalin und um 1170 % höher als die Palmitoleinsäure. Insgesamt entsprach die Wirkung der Fraktion dem Ajmalin-Typ. Abb. 31 zeigt diese Substanzen im Vergleich.

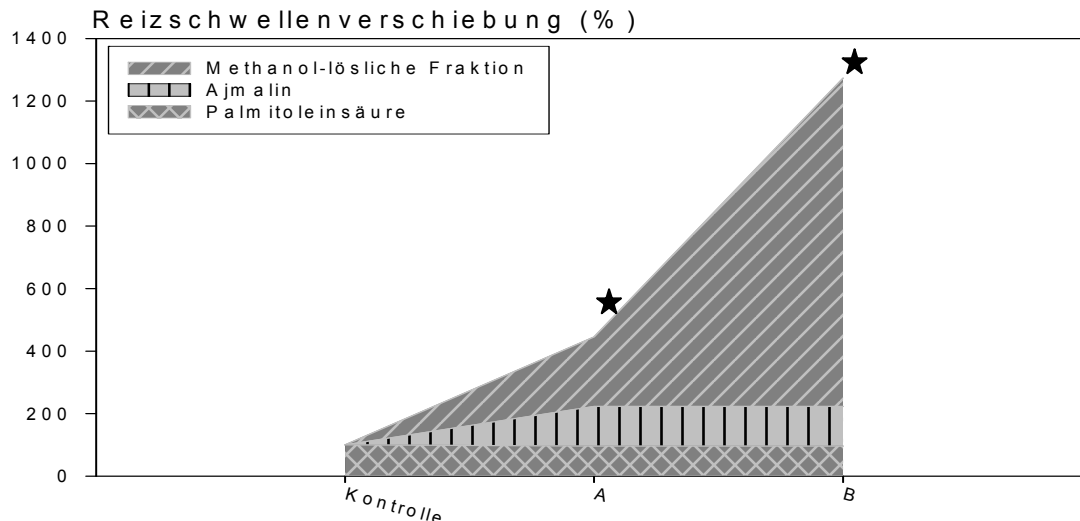


Abb. 31: Vergleich der unterschiedlichen Reizschwellerhöhung am Herzen durch die Methanol-lösliche Fraktion und die Referenzsubstanzen Ajmalin und Palmitoleinsäure. A = 2,16 mg/ml Fraktion, 1 μ mol/l Ajmalin und 10 μ mol/l Palmitoleinsäure; B = 3,59 mg/ml Methanol-lösliche Fraktion, 1 μ mol/l Ajmalin und 10 μ mol/l Palmitoleinsäure. Für Ajmalin und Palmitoleinsäure wurden in dieser Arbeit keine höheren Konzentrationen eingesetzt, da in der Literatur für diese Konzentrationen ausreichende, kardiale Leitungsblockaden beschrieben wurden (DHEIN 1999). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen (= 100 %) sind mit einem ★ gekennzeichnet.

4.2.2 β -mimetische Tachykardie

Zur Untersuchung der Methanol-löslichen Fraktion hinsichtlich β -blockierender Eigenschaften wurde zu Beginn eine Dosis-Wirkungskurve mit Isoprenalin (1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/l) erstellt (s. 3.9.2.4). Nach einem wash out wurde die Dosis-Wirkungskurve von Isoprenalin im Beisein von 2,16 mg/ml Methanol-löslicher Fraktion wiederholt. Durch den Vergleich beider Dosis-Wirkungskurven kann eine Aussage über Agonismus oder Antagonismus (funktionell oder unabhängig) zwischen Isoprenalin und der Methanol-löslichen Fraktion gemacht werden. Sind Isoprenalin und die Fraktion Agonisten, so ist eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve die Folge. Bei einem funktionellen Antagonismus kommt es zu einer Verschiebung und Abflachung der zweiten Dosis-Wirkungskurve (Droge A + B). Dagegen ist bei einem unabhängigen Antagonismus für die Hauptwirkung der Droge A ein gleich bleibender Kurvenverlauf (Droge A + B) charakteristisch (DHEIN 2005 a). Im Folgenden werden die Wirkungen am Herzen durch Isoprenalin und durch Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion vergleichend aufgeführt und beziehen sich auf die höchste Isoprenalin-Konzentration und 2,16 mg/ml Methanol-lösliche Fraktion.

Die Hauptwirkung des Isoprenalins liegt in einer positiven Inotropie und Chronotropie. In der hier vorliegenden Arbeit nahm die Kontraktionskraft (LVP) um $15 \pm 7 \%$ zu. Die basale Zykluslänge (BCL) wurde um $35 \pm 3 \%$ verkürzt und der relative Koronarfluss (rCF) um $30 \pm 5 \%$ verringert. Die Inotropie (LVP) wurde durch Isoprenalin in Kombination mit der Methanol-löslichen Fraktion um $22 \pm 18 \%$ verbessert und die Zykluslänge (BCL) um $19 \pm 30 \%$ verlängert (s. Anhang 3, Abb. 1). Der relative Koronarfluss wurde um $35 \pm 8 \%$ vermindert. Abbildung 32 veranschaulicht den Vergleich zwischen Isoprenalin und Isoprenalin mit der Methanol-löslichen Fraktion auf die Kontraktionskraft des Herzens und zeigt, dass die Methanol-lösliche Fraktion keine β -Rezeptoren am Herzen blockiert. Elektrophysiologisch konnte bei Isoprenalin eine Konstanz der PQ-Zeit mit $-1 \pm 2 \%$ und eine Verkürzung der ST-Strecke um $48 \pm 8 \%$ erfasst werden. Bei der Kombination von Isoprenalin und der Methanol-löslichen Fraktion wurde die PQ-Zeit um $29 \pm 20 \%$ verlängert und die ST-Hebung um $7 \pm 17 \%$ verkürzt. Die Gesamtaktivierungszeit (TAT) konnte durch Isoprenalin $10 \pm 4 \%$ verlängert werden. Durch den Einfluss von Isoprenalin mit der Fraktion wurde die Gesamtaktivierungszeit um $58 \pm 42 \%$ verzögert (s. Anhang 3 Abb. 2). Die lokale Potentialdauer (ARI) verringerte sich unter Isoprenalin um $55 \pm 7 \%$ und die Dispersion von ARI um $24 \pm 16 \%$. Dagegen wurde unter dem Einfluss von Isoprenalin mit der Methanol-löslichen Fraktion bei einer Verringerung der lokalen Potentialdauer um $20 \pm 13 \%$ ein Anstieg der Dispersion von ARI um $45 \pm 24 \%$ verzeichnet (s. Anhang 3 Abb. 3 + 4). Sowohl unter Isoprenalin (um $33 \pm 3 \%$) als auch unter der Kombination mit der Methanol-löslichen Fraktion (um $29 \pm 2 \%$) wurde ein Abfall der Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte (BTP) erfasst. Die Vektorfeldähnlichkeit fiel unter Isoprenalin um $76 \pm 6 \%$ und unter der Methanol-löslichen Fraktion um $82 \pm 1 \%$.

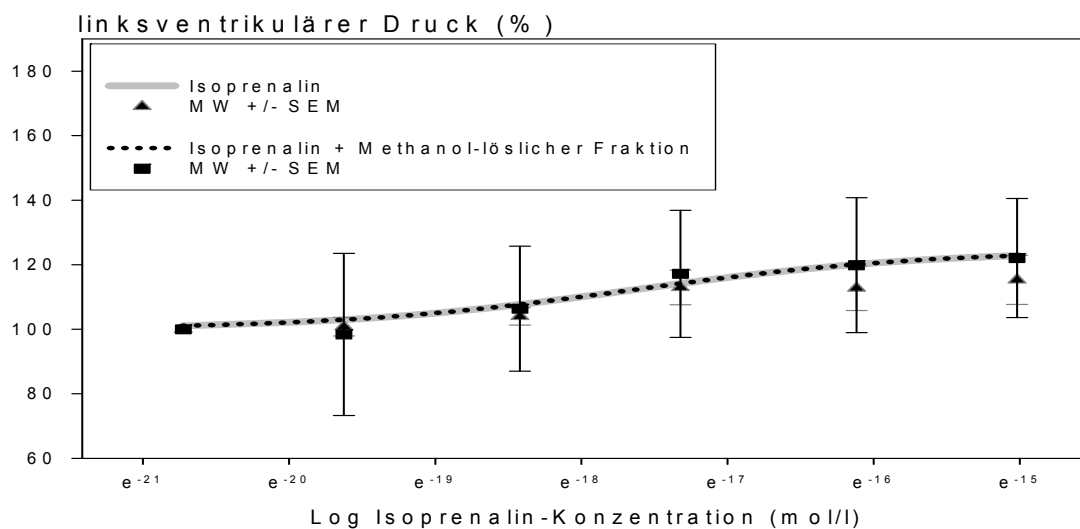


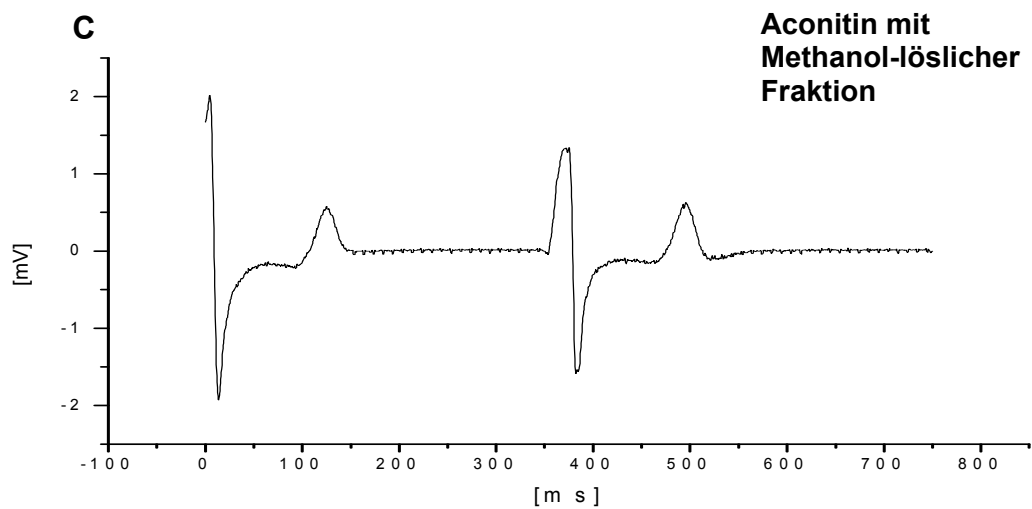
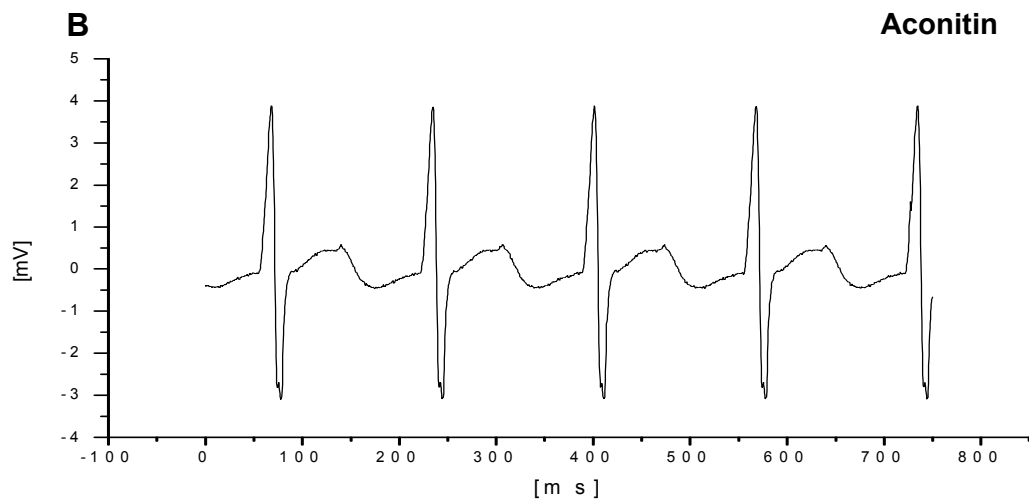
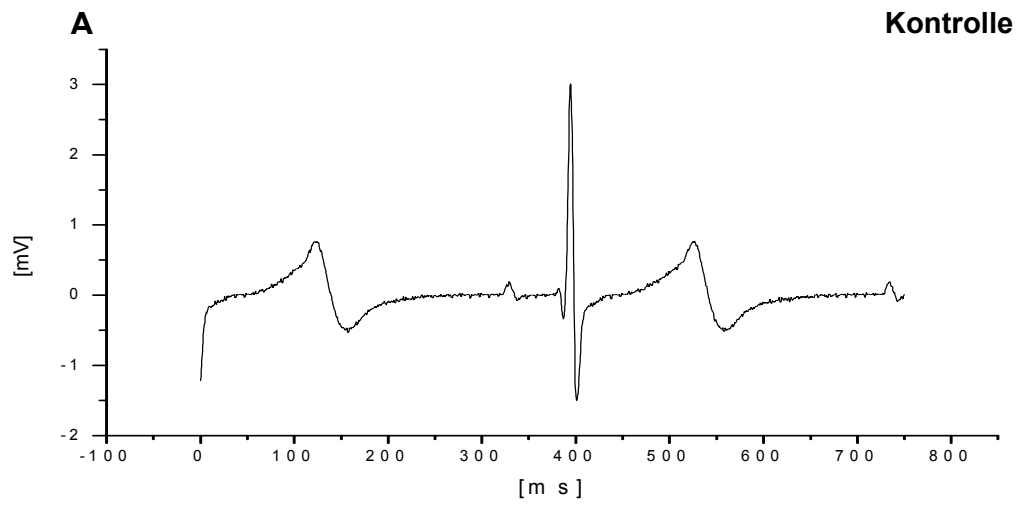
Abb. 32: Vergleich von Isoprenalin mit der Kombination Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion im Hinblick auf die Kontraktionskraft (LVP) des Herzens. Beide Kurven sind deckungsgleich.

4.2.3 Monomorphe ventrikuläre Tachykardie

Aconitin löste in einer Konzentration von 0,1 µmol/l eine monomorphe ventrikuläre Tachykardie am isolierten Kaninchenherzen aus. Mit dieser Versuchsreihe sollte getestet werden, ob die Methanol-lösliche Fraktion Natrium-Kanal blockierende Eigenschaften besitzt und somit die durch Aconitin induzierte und aufrecht erhaltene Vergiftung beeinflussen konnte. Die Methanol-lösliche Fraktion wurde mit zwei Dosierungen eingesetzt, die im Vorversuch als therapeutisches Fenster ermittelt wurden: 2,52 mg/ml (= 3,5 mg/ml Soxhlet-Extrakt) und 2,7 mg/ml (= 3,75 mg/ml Soxhlet-Extrakt). Höhere Konzentrationen verursachten einen Herzstillstand, niedrigere Konzentrationen zeigten keine Wirkung. Die im Folgenden für die Fraktion aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf 2,7 mg/ml. Abbildung 33 zeigt das epikardiale Potential des Herzens unter Kontrollbedingungen (A) sowie die Veränderungen des epikardialen Potentials unter dem Einfluss von Aconitin (B), unter Aconitin mit Methanol-löslicher Fraktion (C) und während des wash outs (D).

Die Veränderungen der funktionellen und physiologischen Parameter durch die Methanol-lösliche Fraktion sind im Bezug zu den Veränderungen durch das Aconitin zu sehen. Die funktionellen Parameter LVP, rCF und BCL wurden durch Aconitin vermindert. Der linksventrikuläre Druck (LVP) wurde um 43 ± 7 %, der relative Koronarfluss (rCF) um 25 ± 5 % verringert und die basale Zykluslänge (BCL) um 59 ± 4 % verkürzt. Letzteres äußerte sich in einer tachykarden Herzfrequenz (s. Abb. 33 B). Auffällig bei der Gabe der Methanol-löslichen Fraktion zum Aconitin war eine deutliche Verlangsamung der Zykluslänge (um 91 ± 19 %) und damit eine Senkung der Herzfrequenz (s. Abb. 33 C; Anhang 4, Abb.1). Der Abfall des linksventrikulären Drucks wurde durch die Methanol-lösliche Fraktion nicht aufgehoben, sondern um weitere 6 % gesenkt. Außerdem wurde der relative Koronarfluss durch die Fraktion um 229 ± 52 % erhöht. Elektrophysiologisch konnten sowohl die PQ-Zeit als auch die ST-Strecke nach der Verkürzung durch das Aconitin um 43 % bzw. 25 % durch die Methanol-lösliche Fraktion um 90 % bzw. 25 % verlängert werden (s. Abb. 33 B und C). Aconitin verlangsamte die Gesamtaktivierungszeit um 125 ± 19 % (s. Anhang 4 Abb. 2) und erhöhte die Peak-to-Peak Amplitude (PTP) um 37 ± 4 % (s. Abb. 34) gegenüber Kontrollbedingungen. Die Methanol-lösliche Fraktion potenzierte die durch das Aconitin ausgelöste Verlangsamung der Gesamtaktivierungszeit um 350 % und verringerte die PTP-Amplitude um 39 ± 3 %. Die lokale Potentialdauer (ARI) wurde durch Aconitin um 30 ± 5 % vermindert bei einer gleichzeitigen Reduktion der Dispersion um 42 ± 10 %. Die Methanol-lösliche Fraktion verlängerte die lokale Potentialdauer (ARI) um 43 ± 30 % bei einer Erhöhung der Dispersion um 93 %. Die Vektorfeldähnlichkeit und die Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte wurden durch die Fraktion im Vergleich zum Aconitin um 4 %

bzw. um 7 % verbessert (s. Abb. 33 C). Im wash out kehrten die Symptome der Aconitin-induzierten Tachykardie zurück (s. Abb. 33 D).



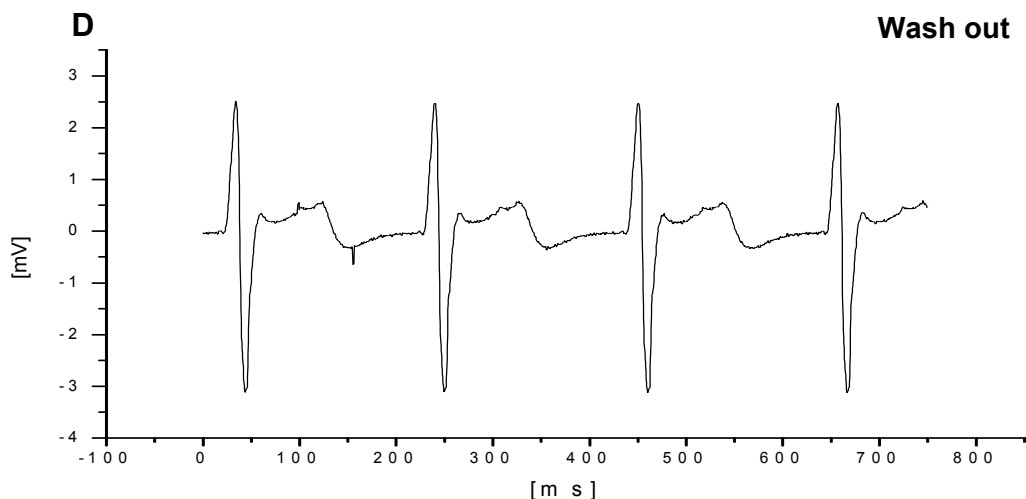


Abb. 33: Repräsentative Aufzeichnungen von Veränderungen des epikardialen Potentials am isolierten Kaninchenherzen unter Aconitin (B), Aconitin mit Methanol-löslicher Fraktion (C) und während des wash outs (D) im Vergleich zur Kontrolle (A). Im Gegensatz zur hydrophilen Fraktion konnte Aconitin nicht ausgewaschen werden.

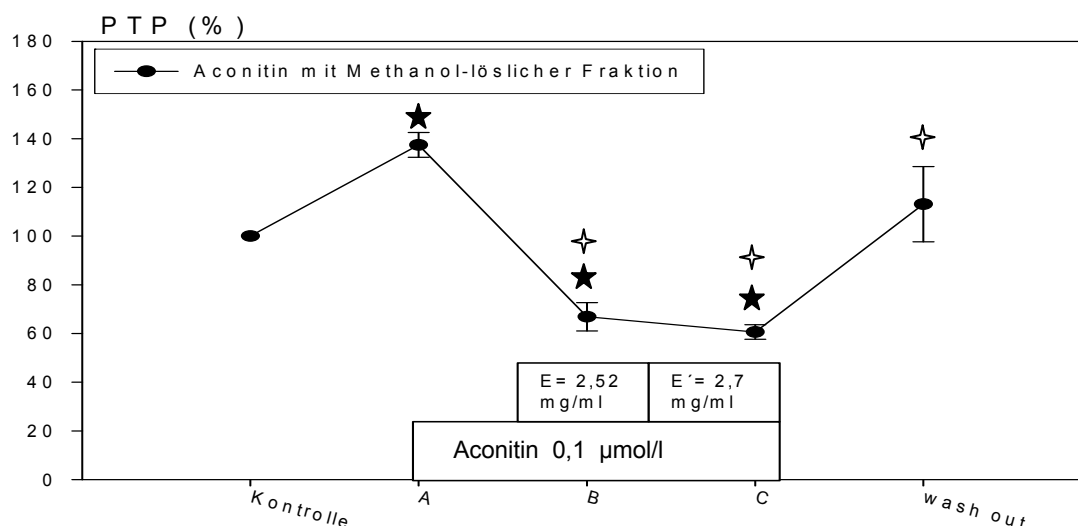


Abb. 34: Veränderung der Peak-to-Peak Amplitude (PTP) durch Aconitin und die Methanol-lösliche Fraktion. A= Gabe von 0,1 µmol/l Aconitin; B = Applikation von 2,52 mg/ml Methanol-löslicher Fraktion (E) zusätzlich zum Aconitin; C= Applikation von 2,7 mg/ml Methanol-löslicher Fraktion (E') zum Aconitin. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen (= 100 %) sind mit einem ★ gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber Aconitin-Werten sind mit einem ✦ gekennzeichnet.

4.3 In-vivo -Versuche – Extraktwirkungen am narkotisierten Kaninchen

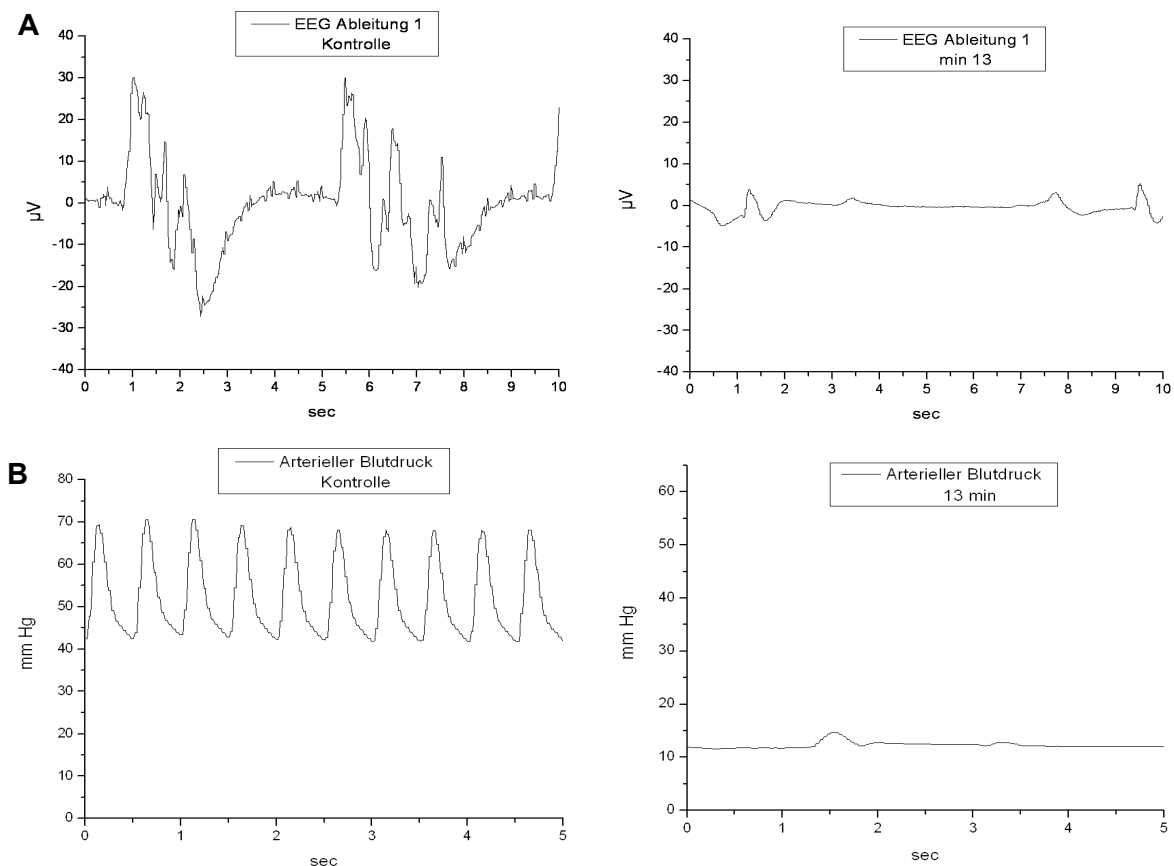
Im Folgenden werden die Beobachtungen am lebenden Tiermodell aufgeführt. Sowohl für die Methanol-lösliche Fraktion als auch für die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion wurden $n = 2$ Versuche mit einer Konzentration von 600 mg/5ml durchgeführt.

4.3.1 Herzultraschall

Zu Beginn der Versuche wurde ein Herzultraschall an narkotisierten Kaninchen durchgeführt, um im Vorfeld einen Eindruck über die kardiologische Gesundheit zu erhalten. Alle Parameter stimmten mit den physiologischen Werten von EWRINGMANN (2005) (s. 2.5.2) überein. Deshalb wird auf die Ergebnisse des Ultraschalls nicht näher eingegangen.

4.3.2 Auswirkungen der Methanol-löslichen Fraktion

Anhand dieser Versuche sollte überprüft werden, welche Auswirkungen die Methanol-lösliche Fraktion auf den gesamten Organismus besitzt. Zusätzlich sollte durch die Reflexüberprüfung und das EEG die Narkosetiefe begutachtet werden (s. 3.9.4). Bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 1,5 ml/min war ein positiver Licht- und Korneareflex zu verzeichnen. Der mittlere Blutdruck sank moderat von 57 mm Hg (Kontrollwert) auf 48 mm Hg. EEG und EKG wiesen keine Veränderungen auf. Bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 2 ml/min waren der Licht- und Korneareflex sofort negativ. Der arterielle Blutdruck sank stark auf 18 mm Hg (s. Abb. 35 B) und die Amplitudenhöhe vom EEG (s. Abb. 35 A) und EKG verkleinerten sich (s. Abb. 35 C) zum Teil bis zum Erscheinen einer Nulllinie. Die Überprüfung der Blutwerte ergab bei der Kontrolle eine Kalium-Konzentration von 4,85 mmol/l, die bei einer Infusionsgeschwindigkeit der Fraktion von 1,5 ml/min auf 7,75 mmol/l anstieg. Wurde die Infusionsgeschwindigkeit auf 2 ml/min beschleunigt, so konnte eine Kalium-Konzentration von 20,44 mmol/l verzeichnet werden und die Tiere starben.



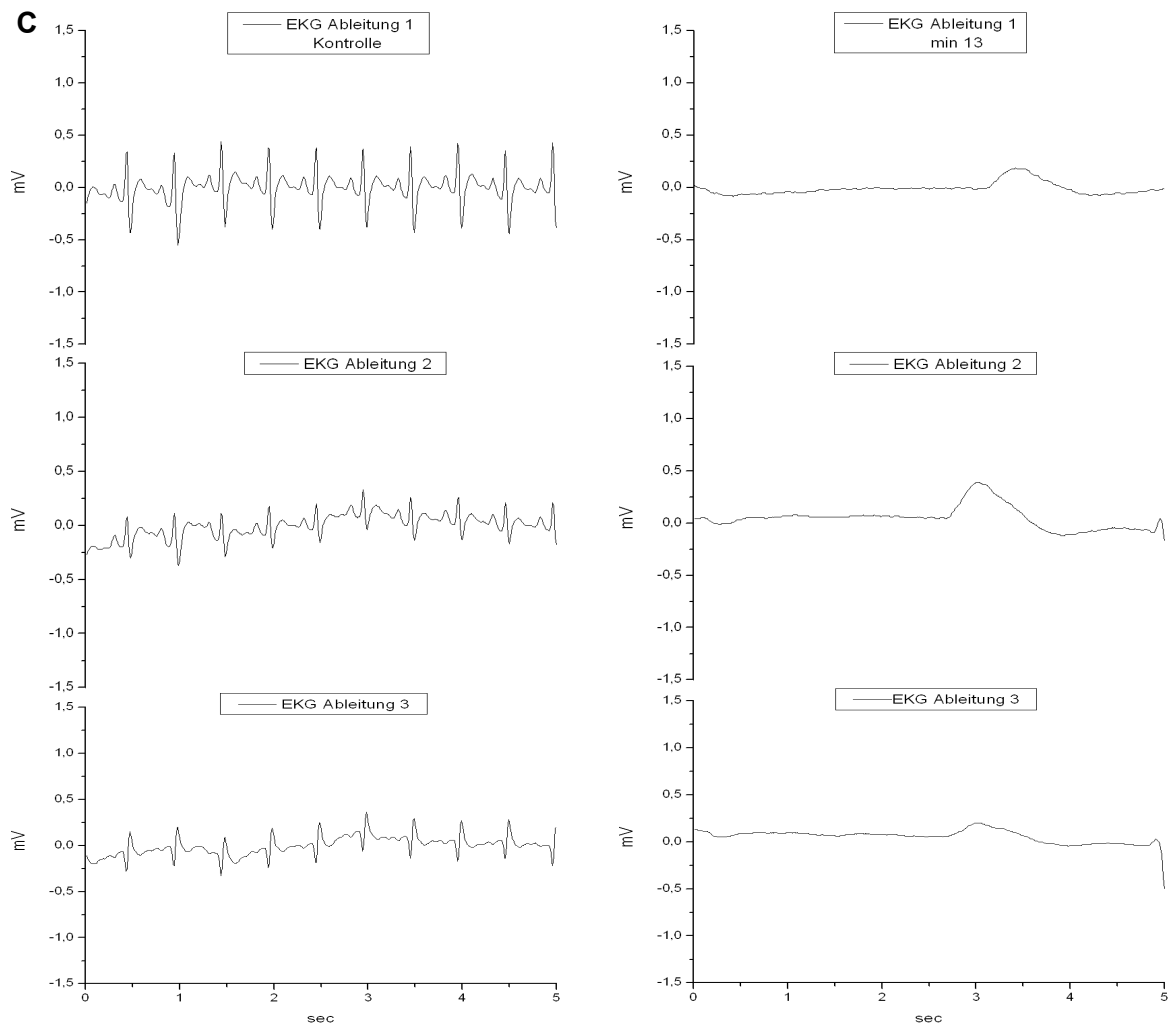


Abb.35: Veränderungen des EEGs (A), des EKGs (C) und des Blutdrucks (B) durch den Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion. Kontrolle links; 13. Minute rechts (d.h. Veränderungen unter Extrakt nach 10 min mit 1,5 ml/min Infusionsgeschwindigkeit und 3 min mit 2 ml/min).

4.3.3 Auswirkungen der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion

Um die letale Auswirkung einer Hyperkaliämie ausschließen und nur die Wirksamkeit der Fraktion testen zu können, wurde der Kalium-Gehalt der Methanol-löslichen Fraktion von 188 mmol/l auf 80 mmol/l mittels eines Kationenaustauschers reduziert (s. 3.6.3). Im Anschluss wurde die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion am lebenden Tiermodell getestet.

Auffällig für diese Versuchsreihe waren bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 2 ml/min ein negativer Licht- und Kornealreflex bei gleichzeitig stabilen Vitalfunktionen. Die Kaninchen starben nicht durch die Fraktion. Der mittlere Blutdruck stieg von ca. 45 mm Hg (Kontrollwert) auf ca. 70 mm Hg bei 2 ml/min an (s. Abb. 36 A). Die EEG-Wellen traten in größeren Abständen auf (s. Abb. 36 B) und die Herzfrequenz stieg von 154 Schläge/min (Kontrollwert) auf 174 Schläge/min an (s. Abb. 36 C). Der Kalium-Gehalt des Bluts ergab unter Kontrollbedingungen eine Konzentration von 3,02 mmol/l und lag damit unter dem physiologischen

Ergebnisse

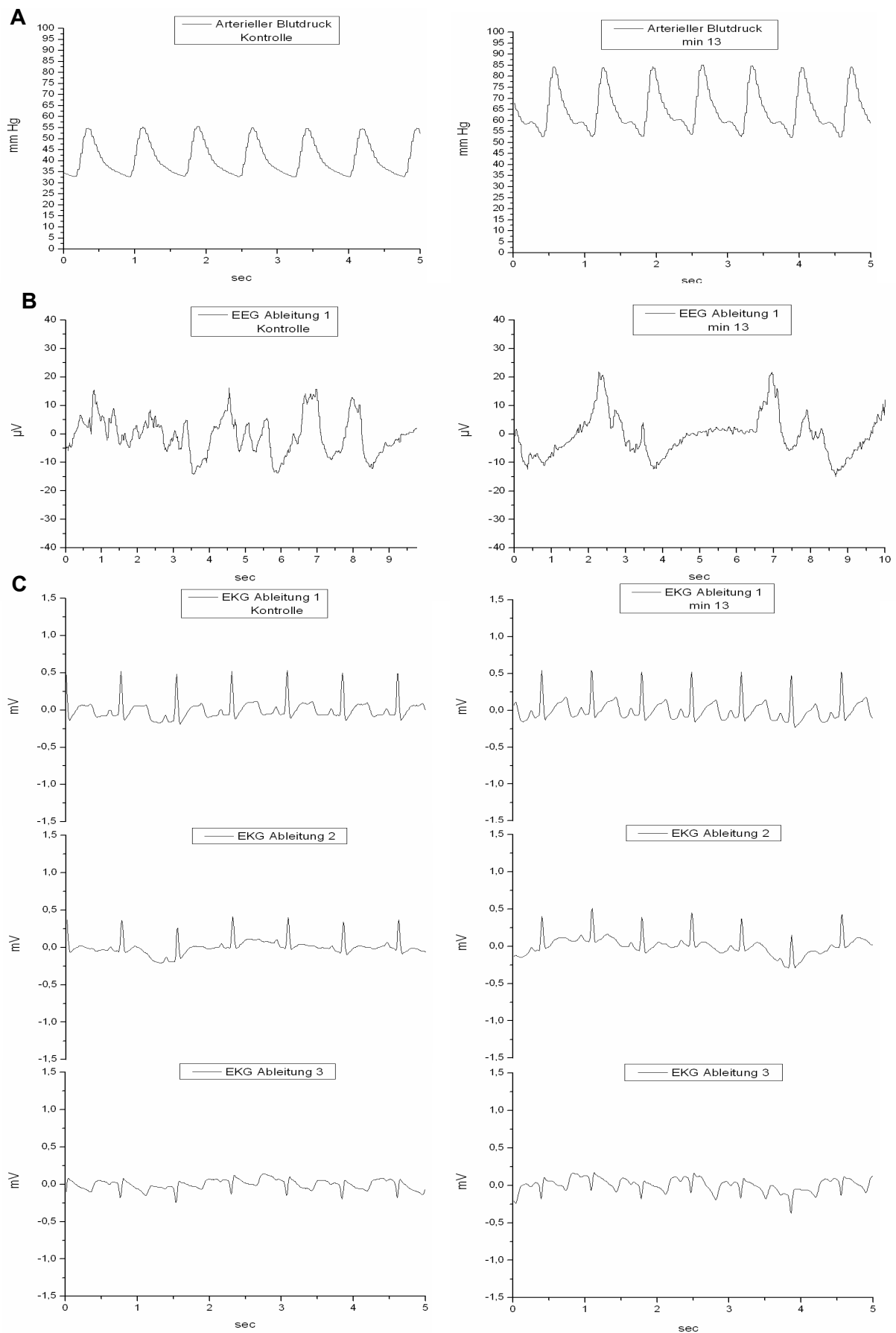


Abb. 36: Veränderung des Blutdrucks (A), des EEGs (B) und des EKGs (C) durch die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion. Kontrolle links; 13. Minute rechts (d.h. Veränderungen unter der Fraktion nach 10 min mit 1,5 ml/min Infusionsgeschwindigkeit und 3 min mit 2 ml/min).

Wert von 4,5–5 mmol/l (EWRINGMANN 2005). Bei einer Infusionsgeschwindigkeit der Fraktion von 1,5 ml/min war der Kaliumgehalt mit 3,1 mmol/l nahezu unverändert und bei 2 ml/min mit 2,96 mmol/l ebenfalls.

4.4 Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion am isolierten Herzen

Bei In-vivo -Versuchen existieren vegetative Gegenregulationen, da der Tierkörper versucht, Effekten der Fraktion entgegenzuwirken (s. 4.3.3). Um die kardialen Auswirkungen der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion unabhängig von vegetativen Gegenregulationen beurteilen zu können, wurde die Kalium-reduzierte Fraktion am isolierten Kaninchenherzen getestet. Mittels eines Kationenaustauschers wurde der Kalium-Gehalt der Fraktion auf 80 mmol/l reduziert. Da die Infusionskonzentration der Fraktion vom Koronarfluss und indirekt proportional vom Perfusionsfluss abhängt, konnten im isolierten Kaninchenherzen Kalium-Konzentrationen von ca. 0,5 mmol/l erreicht werden (s. 3.6.3). Diese Konzentration besaß keine kardialen Auswirkungen, da der physiologische Kalium-Gehalt im Blut bei 4,5 – 5 mmol/l liegt (EWRINGMANN 2005). Diese Versuchsreihe ermöglichte den Vergleich der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion mit der Methanol-löslichen Fraktion hinsichtlich der Auswirkungen unterschiedlicher Kalium-Konzentrationen auf die funktionellen und elektrophysiologischen Parameter. Die Kalium-reduzierte Fraktion wurde mit $n = 3$ Versuchen in den Konzentrationen 2,16 mg/ml und 3,59 mg/ml verabreicht. Alle folgenden Werte beziehen sich auf die niedrigere Konzentration. Ausnahmen diesbezüglich werden aufgeführt. Zum Vergleich mit der Methanol-löslichen Fraktion siehe die $MW \pm SEM$ unter 4.1.7.2.

Insgesamt ist unter einer Kaliumreduktion eine geringere Auswirkung auf alle Parameter festgestellt worden. Die Kalium-reduzierte Fraktion verlangsamte die basale Zykluslänge (BCL) nur um $7 \pm 1 \%$ und der relative Koronarfluss (rCF) erhöhte sich um $30 \pm 2 \%$. Der linksventrikuläre Druck (LVP) des Herzens wurde um $17 \pm 8 \%$ reduziert (s. Abb. 37). Eine Konstanz der PQ-Zeit, des QRS Komplexes sowie eine Verlängerung der ST-Strecke um $8 \pm 5 \%$ wurden verzeichnet. Die Gesamtaktivierungszeit (TAT) veränderte sich mit $1 \pm 6 \%$ kaum (s. Anhang 5, Abb. 1). Die Kalium-reduzierte Fraktion veränderte bei 2,16 mg/ml die lokale Potentialdauer (ARI) vergleichbar zu der Methanol-löslichen Fraktion um $18 \pm 3 \%$ (s. Anhang 5 Abb. 2). Die Frequenz-normalisierte Potentialdauer (QTc) erhöhte sich bei 2,16 mg/ml um $14 \pm 2 \%$ und bei 3,59 mg/ml um $19 \pm 12 \%$ (s. Anhang 5 Abb. 3). Dagegen ist ein Dispersionsabfall durch die Kalium-reduzierte Fraktion mit $13 \pm 9 \%$ deutlich (s. Anhang 5, Abb. 4). Sowohl die Peak-to-Peak Amplitude (PTP) als auch die epikardiale Geschwindigkeit (VEL) blieben unverändert. Dagegen konnte eine solide Verlängerung der Wellenlänge bei einer Fraktionskonzentration von 2,16 mg/ml um $21 \pm 12 \%$ und bei 3,59 mg/ml um 42 ± 17

% verzeichnet werden. Abb. 38 veranschaulicht die unterschiedliche Beeinflussung der Wellenlänge durch die Methanol-lösliche Fraktion und die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion. Die Erregungsursprungsähnlichkeit (BTP) wurde um $29 \pm 2 \%$ und die Vektorfeldähnlichkeit um $83 \pm 9 \%$ reduziert.

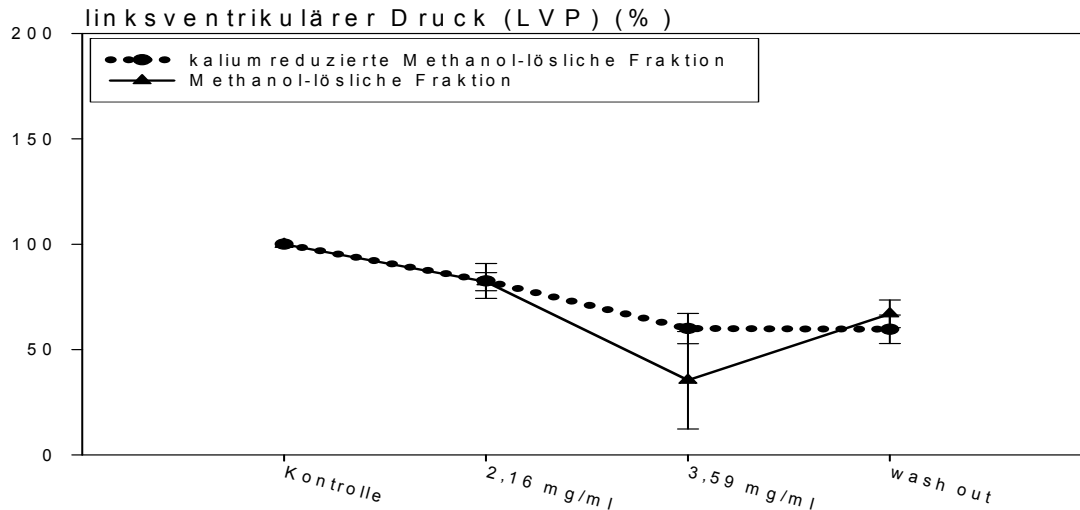


Abb.37: Vergleichende Darstellung der Kalium-reduzierten Fraktion mit der Methanol-löslichen Fraktion hinsichtlich des linksventrikulären Drucks im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

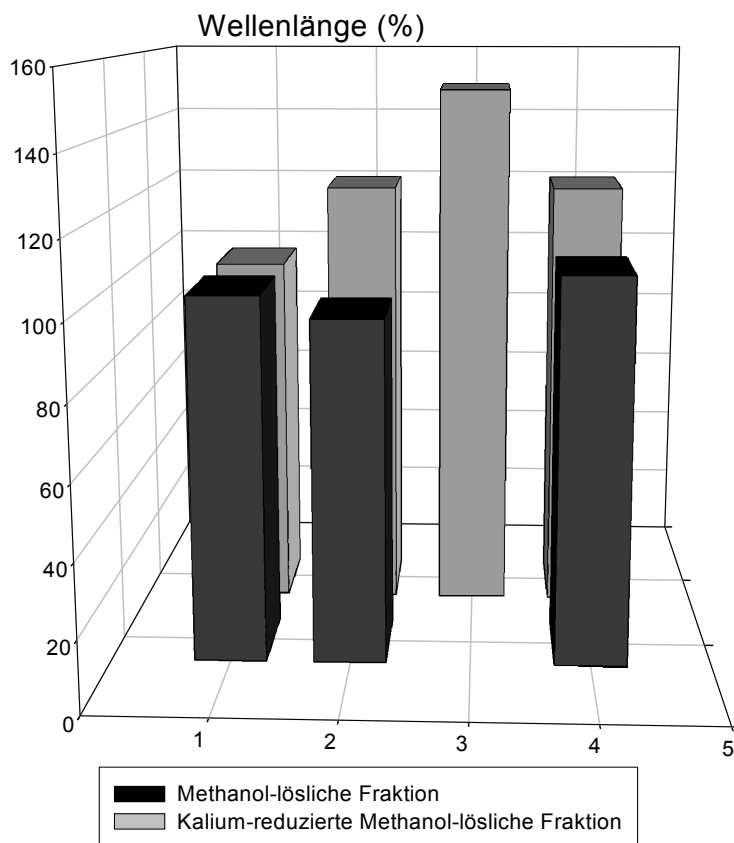


Abb. 38:

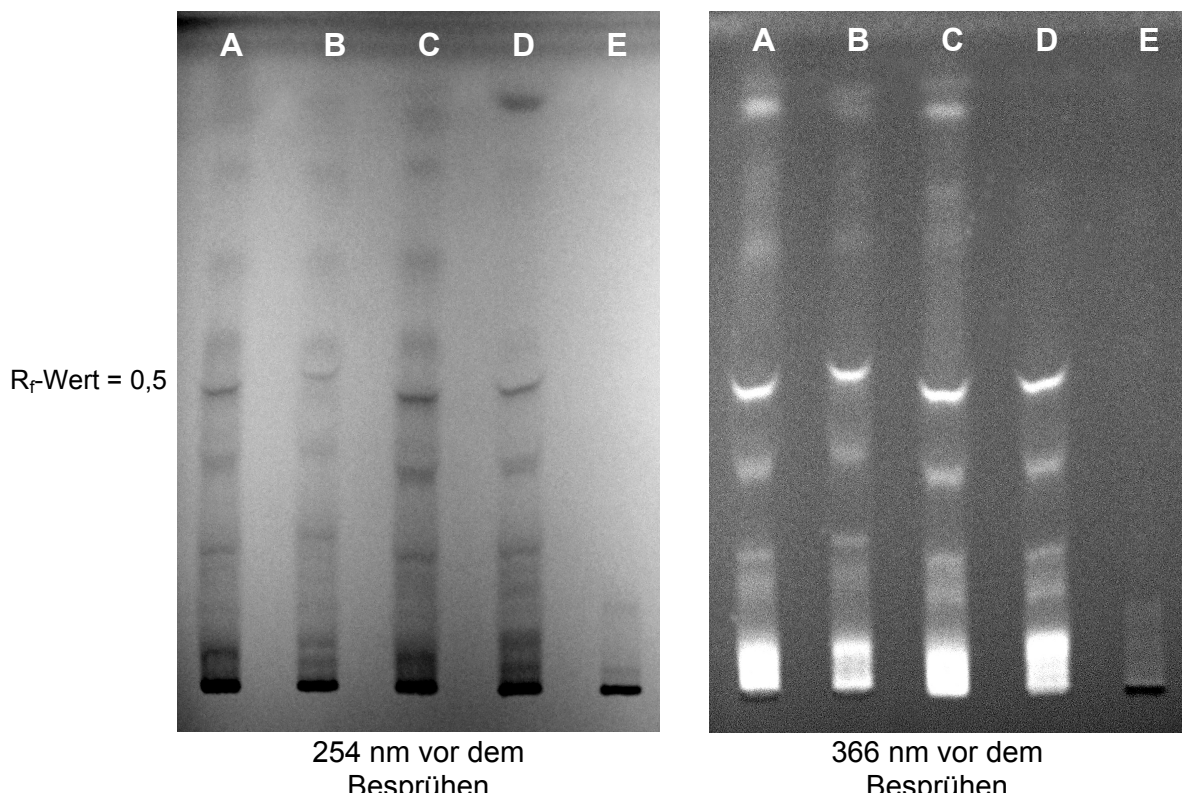
Vergleich der Wellenlänge unter dem Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion und der Kalium-reduzierten Fraktion im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100%). Bei 3,59 mg/ml sind für die Methanol-lösliche Fraktion auf Grund des Herz-stillstands keine Daten vor-handen. 1 = Kontrolle; 2 = 2,16 mg/ml; 3 = 3,59 mg/ml; 4 = wash out

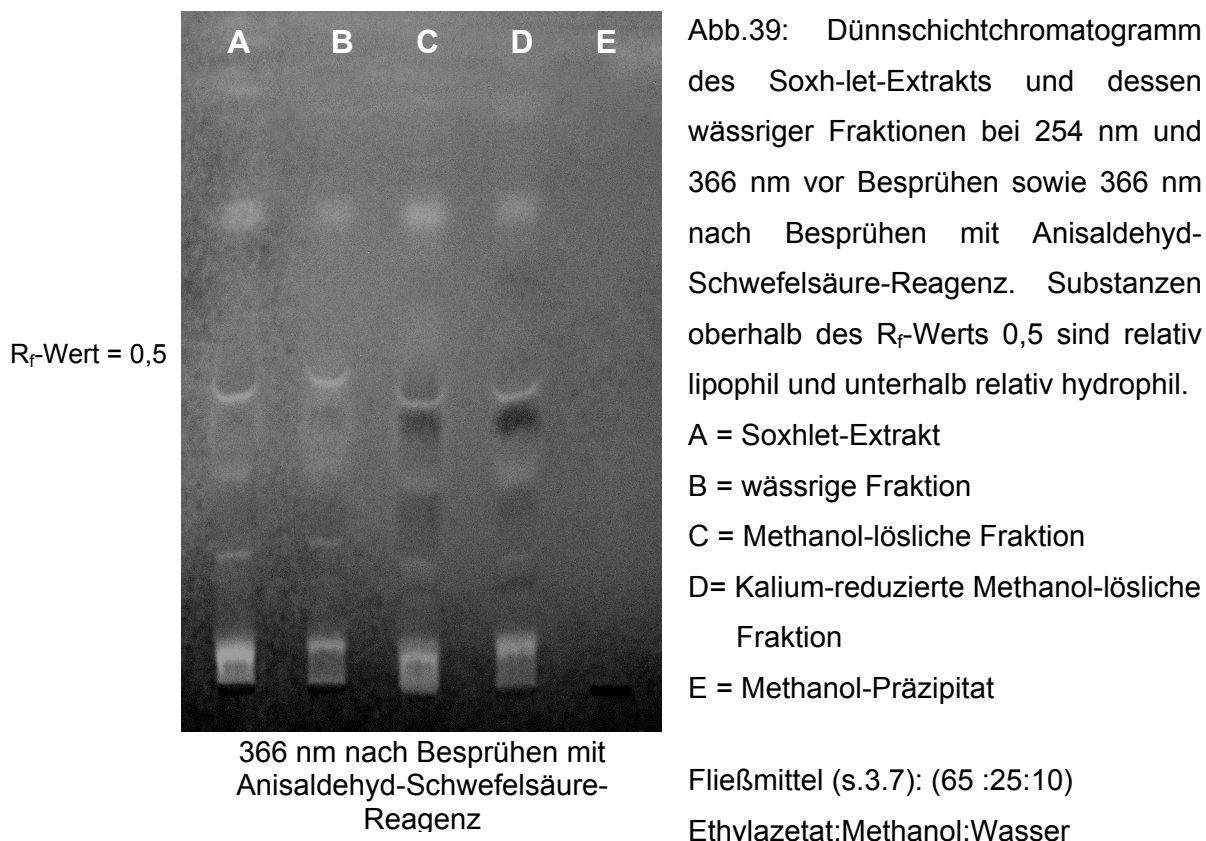
4.5 Dokumentation / Darstellung der Soxhlet-Fractionen

Die Inhaltsstoffe aller hergestellten Extrakte/Fractionen sind, ebenso wie die kardial wirksame(n) Komponente(n), unbekannt. Die in der hier vorliegenden Arbeit aufgeführten Dokumentationsformen dienen lediglich der Darstellung der Inhaltsstofffraktionen und nicht deren Reindarstellung und Strukturaufklärung.

4.5.1 Dünnschichtchromatographie

Im Folgenden werden anhand der Dünnschichtchromatographie Übersichten der Inhaltsstoffe des Soxhlet-Extrakts und dessen wasserlöslichen Fractionen dargestellt. Der Chloroform-Extrakt und der Ethanol/Wasser-Extrakt bleiben in der Darstellung unberücksichtigt, da die kardialen Wirkungen keinen therapeutischen Ansatz aufwiesen. Insgesamt war eine quantitative und qualitative Beurteilung nicht möglich, da die in den Extrakten bzw. Fractionen enthaltenen Inhaltsstoffe unbekannt sind. Deshalb wurde der Retentionsfaktor R_f nicht für jeden Substanzfleck errechnet, sondern ein $R_f = 0,5$ als möglicher Grenzwert zwischen lipophilen und hydrophilen Substanzen angegeben. Abb. 39 zeigt eine DC-Übersicht des Soxhlet-Extrakts aus *Leonurus cardiaca* (A) und der wässrigen Fraction vor der Methanolausschüttlung (B) sowie der Methanol-löslichen Fraction (C), der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraction (D) und des Methanol-Präzipitats (E). Auffällig beim Methanol-Präzipitat war die Stagnation auf der Startlinie auch bei reinem Wasser als Laufmittel.





Quantitative Unterschiede sind bei den unbekannten Substanzen von A–D sichtbar, da einige Substanzflecke deutlicher sind. Jedoch fehlen bei der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion (D) oberhalb vom R_f -Wert zwei Substanzflecke. Ob diese mehr lipophilen Substanzen durch die Kaliumreduktion entfernt oder lediglich die Konzentration stark minimiert wurde, ist unbekannt. Sowohl der Soxhlet-Extrakt als auch dessen wässrige Fraktionen rochen süßlich und besaßen eine klebrige Konsistenz. Deshalb wurde ein Zuckernachweis mit Thymol-Schwefelsäure-Reagenz durchgeführt (s. 3.7). Glukose und Saccharose dienten als Referenzen (s. Anhang 6, Abb. 1). Substanzflecke mit Größe und/oder Struktur von Glukose und Saccharose waren deutlich in gleicher Laufstreckenhöhe sichtbar. Dabei ist bei den Fraktionen A-D im Bereich der Referenzsubstanz Glukose die Ausprägung der Substanzflecke deutlich stärker als die in der Höhe der Saccharose.

4.5.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Mit dieser Chromatographietechnik wurde ein Fingerprint der Methanol-löslichen Fraktion und deren Kalium-reduzierten Fraktion angefertigt, anhand derer eine vergleichende Darstellung der unbekannten Pflanzeninhaltsstoffe möglich war. Beide Fraktionen wurden im Linienchromatogramm bei 215 nm dargestellt und miteinander verglichen (s. Anhang 6, Abb. 2 A, B). Insgesamt konnten 6 Peaks verzeichnet werden. Zusätzlich ermöglichte die 3D-Darstellung des UV-Spektrums die Betrachtung aller Wellenlängen und damit die UV-Absorptionseigenschaften beider Fraktionen (s. Anhang 6, Abb. 3 A, B). Das Muster beider Fingerprints war nahezu kongruent. Bei einem Vergleich der Absorptionseinheiten (AU)

beider Fraktionen war bei der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion eine geringere Absorption vorhanden als bei der Methanol-löslichen Fraktion, so dass durch die Entfernung von Kalium aus der Methanol-löslichen Fraktion gleichzeitig eine quantitative Reduktion der Fraktionsinhaltsstoffe erfolgte. Das Absorptionsmaximum der Peaks lag zwischen 200 und 230 nm. Peak 3, 4, 5 und 6 weisen ein weiteres Absorptionsmaximum bei ca. 300 nm auf.

5 DISKUSSION

Leonurus cardiaca ist eine Pflanze, die seit Jahrhunderten u.a. gegen nervöse Herzbeschwerden ohne bisher gesicherte Untersuchungen eingesetzt wurde (DAB-KOMMENTAR 1999). Sowohl spasmolytische als auch sedierende, blutdrucksenkende und uteruskontrahierende Wirkungen werden dieser Pflanze nachgesagt (s. 2.1.1 und 2.1.2). In der hier vorgestellten Arbeit sollte untersucht werden, ob *Leonurus cardiaca* antiarrhythmische Wirkungen am Herzen besitzt, die einen prophylaktischen und/oder therapeutischen Einsatz bei Tier und Mensch gestattet (s. 2.3). Ausgangspunkt war die Herstellung von drei Extrakten (s. Abb. 4), die auf Grund der unterschiedlichen Polarität der Lösungsmittel verschiedene Pflanzeninhaltsstoffe beinhalten (s. 3.5 und 3.6). Die gewonnenen Extrakte wurden am isolierten Kaninchen-Herzen nach Langendorff mittels einer epikardialen Mapping-Technik getestet (s. Abb. 6). Vier elastische Platten mit insgesamt 256 Elektroden wurden am Herzen angelegt und ermöglichten die Aufzeichnung epikardialer Potentiale. So konnten Aktivierungsmuster und die Erregungsausbreitung im Herzen unter Kontrollbedingungen sowie die Veränderung funktioneller und elektrophysiologischer Parameter unter Extrakteinfluss registriert, dokumentiert und analysiert werden (s. 3.9). Zu Beginn wurden alle drei Extrakte mit $n = 3$ Versuchen durchgeführt und ausgewertet. Anhand der Auswertungen konnten erste Aussagen bezüglich therapeutisch anwendbarer, kardialer Effekte der Extrakte getroffen werden (s. 4.1). Der Extrakt mit den günstigsten kardialen Effekten wurde mit $n = 6$ vervollständigt und im weiteren Verlauf fraktioniert. Für die folgenden Versuchsreihen (Fraktionen) wurden $n = 3$ Versuche bei therapeutisch nicht wirksamen bzw. einsetzbaren Wirkungen und $n = 6$ Versuche bei günstigen kardialen Effekten durchgeführt. Eine Ausnahme ist die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion (s. 4.3 und 4.4), die einen Überblick über die Wirkungen der Methanol-löslichen Fraktion ohne Kalium geben und der Beginn für weitere Arbeiten darstellen sollte. Im Folgenden werden die Extraktionsverfahren diskutiert.

5.1 Aspekte der Extraktion

Allen Extraktionsverfahren ist gemeinsam, dass ein Konzentrationsgleichgewicht der Pflanzeninhaltsstoffe zwischen Lösungsmittel und Pflanze einen Stillstand des Extraktionsvorgangs zur Folge hat. Je höher der Zerkleinerungsgrad der Pflanze, desto schneller kann extrahiert werden und desto schneller stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht ein (LIST u. SCHMIDT 1984 b). Deshalb ist ein ständiger Austausch des Lösungsmittels zur Schaffung eines neuen Gradienten von Vorteil. Sowohl der Chloroform-Extrakt als auch der Ethanol-Wasser-Extrakt wurden mit dem Verfahren der Mazeration hergestellt. Die Mazeration ist kein erschöpfendes Extraktionsverfahren wie die

Soxhlet-Extraktion. Letztere Methode erlaubt die erschöpfende Extraktion des Pflanzmaterials und ist trotz hohem Zeit- und Apparaturaufwand effektiv. Regelmäßiges Erneuern der Lösungsmittel ermöglicht auch bei der Mazeration eine gute Extraktion und erfordert einen relativ hohen Arbeits- und Materialaufwand. Zusätzlich spielt die Temperatur eine wichtige Rolle. Je höher die Temperatur ist, desto schneller verschiebt sich das Extraktionsgleichgewicht in Richtung des Lösungsmittels. Deshalb begünstigten erhöhte Temperaturen, ständiger Austausch gegen frische Lösungsmittel und der Zerkleinerungsgrad der Pflanze die Extraktionsvorgänge (LIST u. SCHMIDT 1984 b). Zusätzlich ließ sich mit dem pH-Wert und mit der Polarität des Lösungsmittels die Selektivität einer Extraktion beeinflussen. Mit der alkalischen Chloroform-Extraktion bei einem pH-Wert = 9 wurde auf die zusätzliche Extraktion von Alkaloiden spekuliert, die in der Medizin häufig eine große Rolle spielen (z.B. *Atropa belladonna*). Das Chloroform sollte hauptsächlich unpolare Stoffe aufnehmen, das Ethanol-Wasser-Gemisch mittel- bis polare Stoffe und das Wasser als Lösungsmittel bei der Soxhlet-Apparatur polare Stoffe (s. 3.5). Dadurch konnten drei verschiedene Extrakte hergestellt werden, die durch unterschiedliche Inhaltsstoffe vermutlich auch andere Wirkprinzipien, wenn überhaupt vorhanden, aufweisen würden.

5.2 Bedeutung einzelner Parameter des epikardialen Mapping für die Arrhythmogenese

Anhand von Mapping-Studien konnte belegt werden (DHEIN et al. 1990; DHEIN 1992), dass einer Arrhythmie immer ein Zerfall der Erregungsgeometrie vorausgeht und 6 Parameter zur Erkennung des Zerfalls aufgeführt werden konnten. Im Folgenden werden diese Parameter (s. 3.9.3) hinsichtlich pro - und antiarrhythmischer Potentiale erläutert.

1. Verminderung der Vektorfeldähnlichkeit (VEC) < 10 %
2. Verminderung der Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte (BTP) < 50 %
3. Verkürzung der lokalen Potentialdauer (ARI) sowie die Verlängerung > 30 %
4. Zunahme der Dispersion der lokalen Potentialdauer
5. Verkürzung der epikardialen Wellenlänge
6. Regionale Unterschiede bei elektrophysiologischen Parametern

Gegensätzliche Veränderungen der oben genannten Parameter besitzen z.T. antiarrhythmische Eigenschaften und werden im Folgenden global mit den proarrhythmischen Dispositionen erläutert:

Die Betrachtung der Erregungsursprungspunkte und des Vektorfelds ermöglicht die Charakterisierung der Geometrie des epikardialen Aktivierungsprozesses. Sie gestatten den Vergleich der Schlag-zu-Schlag Variabilität, also der Ähnlichkeit aufeinander folgender

Herzschläge (DHEIN et al. 1993). Unter Kontrollbedingungen konnte bei den Erregungsursprungspunkten eine Schlag-zu-Schlag Variabilität von $78 \pm 1 \%$ und bei dem Vektorfeld von $57 \pm 2 \%$ verzeichnet werden. Die relativ hohen Abweichungen zweier Schläge sind durch die Impulsweiterleitung über verschiedene, jedoch gleichwertige Leitungsbahnen und durch mikroskopische Nicht-Uniformitäten, bedingt durch Inhomogenitäten auf Zellebene, zu erklären. Trotz unterschiedlicher Erregungsausbreitungsbahnen entstehen rhythmische Kontraktionen des Herzens (DHEIN 1990). Die höhere Konstanz der Erregungsursprungspunkte basiert vermutlich auf anatomisch unter den Punkten endenden Purkinje-Fasern, sogenannten M-Zellen, womit eine Verminderung der BTP-Ähnlichkeit auf eine Veränderung am Erregungsleitungssystem schließen lässt (DHEIN 1992). Das Vektorfeld als Parameter für die Erregungsausbreitungsgeometrie reflektiert bei einer Abnahme der Vektorfeld-ähnlichkeit eine Änderung des Ausbreitungsmusters. Dies kann eine Arrhythmie zur Folge haben, da bei einer deutlichen Abweichung von den herkömmlichen Leitungsbahnen die Erregungswelle auf refraktäre Zellen treffen und die ursprüngliche Welle in Teilwellen zerfallen kann. Zusätzlich wird die hohe Schlag-zu-Schlag Variabilität der Vektorfeld-ähnlichkeit durch die Anisotropie des Herzgewebes im stärkeren Maß bedingt als die BTP-Ähnlichkeit, da die myokardiale Erregungsausbreitung von den unterschiedlichen elektrischen Widerständen beeinflusst wird, die Leitungsbahnen der Erregungsursprungspunkte dagegen vordefiniert sind. Sowohl eine negative Beeinflussung des Erregungsleitungssystems als auch der epikardialen Impulsverbreitung können zu Arrhythmien führen. Eine Erhöhung der Vektorfeld- und BTP-Ähnlichkeit deutet eine Stabilisierung des Erregungsmusters und damit einen antiarrhythmischen Effekt an.

Verkürzungen der lokalen Potentialdauer sind Ausdruck einer kürzeren Refraktärphase, durch die vorzeitig depolarisierende Impulse auf wieder erregbare Zellen treffen können (DHEIN et al. 1993). Sind einige Zellen refraktär, andere bereits inaktiv (ruhend), so kann dies zu unidirektionalen Leitungsblöcken und Reentry-Arrhythmien führen. Eine massive Verlängerung der lokalen Potentialdauer um $> 30 \%$ kann ebenfalls eine Arrhythmie auslösen, da das physiologische Erregungsausbreitungsmuster verändert wird. Während der verlängerten Refraktärzeit können durch frühe und späte Nachdepolarisationen ventrikuläre Tachykardien entstehen. Werden die Tachykardien desorganisiert, entwickeln sich Torsade-de-points Arrhythmien, aus denen ein Kammerflimmern resultieren kann (KATZ 2001). Eine Verlängerung der lokalen Potentialdauer bis 30% jedoch weist antiarrhythmische Eigenschaften auf (DHEIN 1992), da Reentry-Arrhythmien durch die verlängerte Wellenlänge des kardialen Impulses verhindert werden können und der Grad der Verlängerung kein Risiko für die Entstehung von Torsade-de-Points Arrhythmien darstellt.

Die Dispersion von ARI bezeichnet die Streuung der lokalen Potentialdauer innerhalb des Herzens. Aus einer Zunahme der Dispersion resultiert eine zunehmende Divergenz der Potentialdauer im Herzen. Da die lokale Potentialdauer einen Rückschluss auf die Refraktärzeit ermöglicht (DHEIN 1992), ergibt eine Zunahme der Dispersion der Potentialdauer auch eine Dispersionszunahme der Refraktärzeiten. Daraus ergibt sich, dass benachbarte Zellen zunehmend unterschiedlich refraktär sind und ein arrhythmogenes Potential entsteht (DHEIN 1992). LESH et al. entdeckten 1989, dass eine Zellentkopplung zu einer Zunahme der Dispersion führt. Eine Abnahme der Dispersion wiederum resultiert vermutlich in einer verbesserten Zellkopplung und damit einer Stabilisierung des Herzens, die sich antiarrhythmisch auswirkt.

Die Wellenlänge ist das Produkt aus der lokalen Potentialdauer und der epikardialen Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit. Durch eine Verkürzung der Wellenlänge entsteht eine Prädisposition für kleine Reentry-Arrhythmien, wodurch Extrasystolien und Tachykardien die Folge sein können (MATHES et al. 1985; DHEIN et al. 1993). Eine Verlängerung der Wellenlänge besitzt antiarrhythmische Dispositionen, da gegebenenfalls die Entstehung von Reentry-Kreisen, die bei Wellenlängenverlängerung groß wären, anatomisch nicht möglich sind (DHEIN 1992). Regionale Unterschiede der Herzareale führen zu einer erhöhten Heterogenität innerhalb des Herzens. Dies wiederum kann Ausgangspunkt für Arrhythmien sein, da z.B. unterschiedliche Refraktärzeiten und Leitungsgeschwindigkeiten die Folge sein können.

5.3 Extrakteffekte am isolierten Kaninchenherz

Im Folgenden werden die kardialen Auswirkungen der Extrakte/Fractionen aus Leonurus cardiaca auf das isolierte Kaninchenherz unter dem Aspekt pro- und antiarrhythmischer Eigenschaften diskutiert. Sowohl funktionelle als auch elektrophysiologische Parameter werden mit einbezogen. Die eingesetzten Konzentrationen der Extrakte/Fractionen orientierten sich an den Effekten am Herzen.

5.3.1 Ausgangsextrakte unterschiedlicher Polarität

5.3.1.1 Wirksamkeit des alkalischen Chloroform-Extrakts

Der alkalische Chloroform-Extrakt (s. 4.3.1) wurde in den Konzentrationen 0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml eingesetzt und zeigte schon bei der niedrigen Konzentration eine starke Grauverfärbung des Herzens mit irreversibler Veränderung der funktionellen und elektrophysiologischen Parameter. Die verlangsamte atrioventrikuläre Überleitungszeit, die zunehmende Gesamtaktivierungszeit, die Bradykardie und die Erhöhung der QRS-Dauer

weisen auf eine massive Beeinträchtigung der Geschwindigkeit des Erregungsleitungssystems hin. Bei der QRS-Dauer zeigten sich regionale Unterschiede. Zusätzlich wurden die epikardiale Geschwindigkeit und die Peak-to-Peak Amplitude sowie die Kontraktionskraft des Herzens stark reduziert, so dass insgesamt sowohl das Myokard und als auch das Epikard negativ beeinträchtigt wurden. Der relative Koronarfluss wurde stark erhöht. Da die genannten Parameter irreversibel verändert wurden und da alle Herzen dieser Versuchsreihe sofort eine Grauverfärbung aufwiesen, ist anzunehmen, dass der alkalische Chloroform-Extrakt in diesen Konzentrationen toxisch ist. Neben der beschriebenen Minderung der Vitalparameter konnte durch die Verminderung der lokalen Potentialdauer bei einer gleichzeitigen Steigerung der Dispersion um 63 % ein proarrhythmisches Potential verzeichnet werden. Die Reduktion der Vektorfeldähnlichkeit und der Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte wich von den Kontrollbedingungen ab, erreichte aber nicht die oben angegebenen (s. 5.2), potentiell proarrhythmischen Grenzen. Es konnten letztlich keine Effekte beobachtet werden, die antiarrhythmische Eigenschaften aufwiesen. Die beschriebenen Veränderungen deuteten eher auf Herzversagen hin. Deshalb wurde der alkalische Chloroform-Extrakt im weiteren Verlauf der hier vorgelegten Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

5.3.1.2 Wirksamkeit des Ethanol-Wasser-Extrakts

In dieser Versuchsreihe wurde der Extrakt mit 0,1 mg/ml und 1 mg/ml am isolierten Kaninchenherzen eingesetzt (s. 4.1.2). Weder die Erregungsleitung noch die Erregungsbildung wurden ausschlaggebend verändert. Nur die Erhöhung des relativen Koronarflusses weist möglicherweise auf einen Kalzium-Kanal-Antagonisten, der ausschließlich vasodilatierende Eigenschaften besitzt, da keine negative Inotropie vorherrschte. Sowohl die elektrophysiologischen als auch die funktionellen Parameter wiesen nur geringe kardiale Effekte auf und ließen sich nicht in herkömmliche antiarrhythmische Schemata (Vaughan-Williams) einordnen. Deshalb wurde der Ethanol-Wasser-Extrakt im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

5.3.1.3 Wirksamkeit des Soxhlet-Extrakts

Extraktkonzentrationen von 0,1 mg/ml und 1 mg/ml wurden am isolierten Kaninchenherzen getestet (s. 4.1.4) und zeigten folgende kardiale Veränderungen:

Die negative Inotropie, die Bradykardie sowie der erhöhte relative Koronarfluss wiesen zu Verapamil vergleichbaren (DHEIN 1992) und damit vermutlich Kalzium-Kanal-antagonistischen Eigenschaften des Extrakts hin, obwohl die PQ-Zeit nicht verlängert wurde. Die Verwendung einer Low-Ca²⁺-Tyrode-Lösung zur Hervorhebung einer möglichen positiv inotropen Eigenschaft des Soxhlet-Extrakts wurde bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml

durchgeführt. Die Kontraktionskraft des Herzens blieb nahezu konstant. Da der zeitliche Verlauf physiologisch eine Kontraktionskraftminderung bedingen würde (DHEIN 1992), besitzt der Soxhlet-Extrakt vermutlich bei der niedrigen Dosierung eine schwach positiv inotrope Wirkung. Dies ist wiederum bei Herzrhythmusstörungen, die häufig mit einer verschlechterten Kontraktionskraft einhergehen, von Vorteil. Eine vermutlich durch Na-Kanal-Antagonismus (DHEIN 1992) und Hyperkaliämie bedingte Verlängerung der Gesamtaktivierungszeit und eine Abnahme der epikardialen Geschwindigkeit wurde registriert und wies damit auf eine Beeinflussung der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit hin. Durch den Einfluss des Extrakts konnten potentiell antiarrhythmische Veränderungen der elektrophysiologischen Parameter verzeichnet werden. Die Zunahme der lokalen Potentialdauer um 26 % bei einer zeitgleichen Abnahme der Dispersion um 23 % sowie eine Verlängerung der Wellenlänge um 24 % sind zu nennen. Diese Abweichungen weisen Ähnlichkeit mit den durch Klasse III-Antiarrhythmika bedingten Veränderungen auf und könnten daher aus einer Kalium-Kanal-antagonistischen Wirkung des Soxhlet-Extrakts resultieren. Auch sind diese Veränderungen vermutlich unabhängig vom Kalium-Gehalt des Extrakts, da sie unter dem Kalium-reduzierten Extrakt beobachtet wurden. Eine Erhöhung der ST-Hebung festigte diese Vermutung. Sowohl die Ähnlichkeit des Vektorfelds als auch der Erregungsursprungspunkte wurde zwar vermindert, sank jedoch nicht unter die proarrhythmische Grenze. Regional schwankte die Dispersionsminderung der lokalen Potentialdauer von 1 – 17 %, so dass dies der einzige Hinweis auf eine eventuell potentiell proarrhythmische Wirkung ist. Da die Schwankungsbreite relativ niedrig ist, ist das Risiko einer Proarrhythmie vermutlich klein. Der Soxhlet-Extrakt wies somit Eigenschaften mit einem deutlichen antiarrhythmischen Potential auf. Im Hinblick auf die Prophylaxe der Belastungsmiopathie des Schweins und Therapie anderer Herzrhythmusstörungen bei Mensch, Hund und Katze könnten die möglicherweise Kalzium- und Kalium-Kanal-antagonistischen Effekte von Bedeutung sein. Deshalb wurde der Soxhlet-Extrakt mittels Ausschüttlung fraktioniert.

5.3.2 Ausschüttlung des wässrigen Soxhlet-Extrakts

Dieses einfach durchzuführende und effektive Fraktionierungsverfahren ermöglichte die Trennung von Inhaltsstoffen des Soxhlet-Extrakts. Die lipophilen Stoffe reichert sich in der Ethylazetatfraktion an und die hydrophilen in der wässrigen Fraktion. Chloroform besitzt eine stärkere Elutionskraft bei lipophilen Stoffen als Ethylazetat. Um einen lipophilen Restbestandteil in der wässrigen Fraktion ausschließen zu können, wurde deshalb im Anschluss eine Ausschüttlung mit Chloroform durchgeführt. Die Chloroformfraktion wurde nicht am Herzen getestet (s. Abb. 4), da die Ethylazetatfraktion hinreichend Auskunft über eine kardiale Wirkung lipophiler Pflanzeninhaltsstoffe geben konnte. Im Folgenden werden

die Ethylazetatfraktion und die wässrige Fraktion ebenfalls hinsichtlich pro- und antiarrhythmischer Potentiale unter Einbeziehung funktioneller und elektrophysiologischer Parameter des Herzens erläutert.

5.3.2.1 Wirksamkeit der Ethylazetatfraktion

Die Ethylazetatfraktion wurde mit 0,00182 mg/ml und 0,0182 mg/ml am Herzen getestet (s. 4.1.6.1). Die Veränderungen der funktionellen und elektrophysiologischen Werte waren minimal. Einzelne Abweichungen, wie z.B. die Reduktion der Kontraktionskraft um -12 %, sind mit dem physiologischen zeitlichen Verlauf kongruent und basieren deshalb sehr wahrscheinlich nicht auf den Extraktwirkungen. Infolgedessen wurde die Ethylazetatfraktion im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

5.3.2.2 Wirksamkeit der wässrigen Fraktion

In dieser Versuchsreihe wurden Konzentrationen mit 0,0959 mg/ml, 0,479 mg/ml und 0,959 mg/ml am isolierten Kaninchenherzen untersucht (s. 4.1.6.2). Diese Fraktion des Soxhlet-Extrakts (s. Abb. 4) zeigte eine erhebliche Beeinträchtigung des Erregungsbildungs- und -leitungssystems. Da die atrioventrikuläre Überleitungszeit und die Herzfrequenz stark verlangsamt und die Kontraktionskraft des Herzens massiv reduziert (-77 %) sowie der relative Koronarfluss mit +80 % stark erhöht wurden, wird die Vermutung erhärtet, dass eine Kalzium-Kanal antagonistische Wirkung vorhanden ist. Diese Parameter wurden in der wässrigen Fraktion stärker als beim Soxhlet-Extrakt beeinträchtigt und lassen vermuten, dass durch die Fraktionierung kardial wirksame Stoffe konzentriert wurden. Überdies konnte auch die vermutlich Kalium-Kanal blockierende Eigenschaft in der wässrigen Fraktion verstärkt wieder gefunden werden. Dies zeigte sich in einer Erhöhung der ST-Hebung und einer Verlängerung der lokalen Potentialdauer. Die Dispersion der Potentialdauer stieg, im Gegensatz zum Soxhlet-Extrakt, durch die wässrige Fraktion um 42 % an. Letztere beiden genannten Veränderungen sind potentiell proarrhythmisch, da ARI um mehr als 30 % verlängert wurde und die Dispersion massiv anstieg (s. 5.2). Tendenziell könnte sich auch die stark verminderte Vektorfeldähnlichkeit proarrhythmisch auswirken. Die Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte wurde zwar reduziert, unterschritt jedoch nicht die 50 %-Grenze. Die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit wurde durch die wässrige Fraktion gleichermaßen verlangsamt wie durch den Soxhlet-Extrakt. Dies spiegelte sich in einem Anstieg der Gesamtaktivierungszeit und einer Verminderung der epikardialen Geschwindigkeit sowie zusätzlich in einer Verbreiterung des QRS-Komplexes wider, wobei die Wellenlänge nicht beeinflusst wurde. Dies könnte durch eine Natrium-Kanal-Blockade und/oder durch eine Hyperkaliämie bedingt werden. Die wässrige Fraktion zeigte deutliche kardiale Wirkungen. Infolgedessen wurde die wässrige Fraktion weiter fraktioniert. Obwohl die antiarrhythmischen

Tendenzen des Soxhlet-Extrakts auf Grund ausgeprägter Veränderungen in der wässrigen Fraktion nicht wieder gefunden wurden, stimmten die kardialen Wirkungsmuster des Soxhlet-Extrakts und der wässrigen Fraktion überein.

5.3.3 Präzipitation der wässrigen Fraktion

Die Durchführung einer Säulenfraktionierung blieb erfolglos, da einige Inhaltsstoffe der wässrigen Fraktion, vermutlich Gerbstoffe, mit dem Säulenmaterial reagierten. Im Folgenden wurde deshalb die wässrige Fraktion mit Methanol versetzt und somit ein Niederschlag Methanol-unlöslicher Inhaltsstoffe (v.a. Gerbstoffe) bewirkt. Der Gerbstoffanteil der Pflanze *Leonurus cardiaca* ist mit bis zu 9 % (WICHTL 2002) sehr hoch (s. 2.1.2). Nachfolgend werden die kardialen Auswirkungen des Niederschlags und der Methanol-löslichen Fraktion hinsichtlich pro- und antiarrhythmischer Potentiale unter Einbezug funktioneller und elektrophysiologischer Parameter diskutiert.

5.3.3.1 Präzipitat im Vergleich zur Methanol-löslichen Fraktion

Durch diesen Fraktionierungsschritt erfolgte eine Trennung von Wirkprinzipien. Auffällig war dabei vor allem die Dispersion der lokalen Potentialdauer: beim Präzipitat stieg die Dispersion und bei der Methanol-löslichen Fraktion sank sie (s. Abb. 40). Überdies waren die Veränderungen durch die Methanol-lösliche Fraktion reversibel, dagegen bei dem Präzipitat überwiegend irreversibel. Die Veränderungen der elektrophysiologischen und funktionellen Parameter des Präzipitats deuteten auf ein Herzversagen, da die Parameter irreversibel beeinträchtigt wurden (s. 4.1.7.1). Deshalb blieben in der hier vorliegenden Arbeit die Auswirkungen des Präzipitats im Weiteren unberücksichtigt und die Methanol-lösliche Fraktion wurde näher untersucht. In der Methanol-löslichen Fraktion zeichneten sich ebenfalls vermutliche Kalzium-, Kalium- und Natrium-Kanal antagonistische Reaktionen ab (s. 4.1.7.2). Erstere bewirkte eine der wässrigen Fraktion vergleichbare Reduktion der Kontraktionskraft (s. Abb. 20 und 21) sowie eine vergleichbare Verlängerung der PQ-Zeit (s. Anhang 2, Abb. 15). Die Frequenzverlangsamung und die Erhöhung des relativen Koronarflusses waren solider als bei der wässrigen Fraktion, so dass vermutlich durch den zweiten Fraktionierungsschritt erneut eine Anreicherung wirksamer Komponenten stattfand. Die Bradykardie führte bei n = 4 Versuchen zu einem reversiblen Herzstillstand und konnte möglicherweise durch eine starke Blockade von Kalzium-Kanälen oder auch durch eine Hyperkaliämie bedingt sein (s. Abb. 20). Eine vermutliche Blockade repolarisierender Kalium-Kanäle verdeutlichte sich in einem Anstieg der lokalen Potentialdauer, einer Erhöhung der ST-Hebung sowie in einer Minderung der Dispersion von ARI (s. Abb. 23).

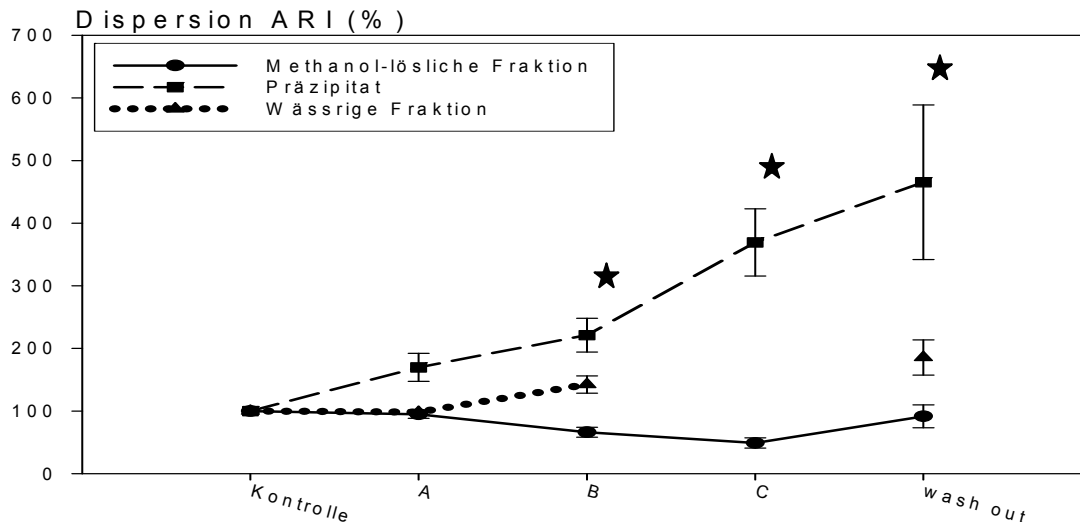


Abb. 40: Darstellung der Trennung von Wirkprinzipien, die aus der Präzipitation mit Methanol resultieren. Da alle Fraktionen prozentuale Anteile am Soxhlet-Extrakt sind, entsprechen die dargestellten Konzentrationen A, B, C folgenden Soxhlet-Konzentrationen: A= 0,1 mg/ml; B= 1 mg/ml; C= 3 mg/ml. Die wässrige Fraktion wurde mit 3 mg/ml nicht getestet, daher ist bei dieser Konzentration die Kurve nicht vollständig. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %) sind mit einem ★ gekennzeichnet.

Die Verlangsamung der Gesamtaktivierungszeit und die Verbreiterung des QRS-Komplexes könnten die Folge einer Natrium-Kanal-Blockade sowie einer Hyperkaliämie sein. Beide Merkmale wurden geringer beeinflusst als durch die wässrige Fraktion. Die Methanol-lösliche Fraktion wies im Vergleich zu der wässrigen Fraktion und dem Soxhlet-Extrakt die größte antiarrhythmische Tendenz und kardiale Wirksamkeit auf (s. 4.1.7.2). Die Fraktionierung des Soxhlet-Extrakts führte deshalb wahrscheinlich zu einer Anreicherung der kardial wirksamen Komponenten. Zum anderen konnten überwiegend proarrhythmisch wirkende Inhaltsstoffe vom antiarrhythmisch wirksamen Prinzip getrennt werden. Die lokale Potentialdauer nahm um 16 % zu und lag damit im Maximum der potentiell antiarrhythmischen Wirkung. Die Dispersion von ARI wurde um -51 % gemindert, was mit einer verbesserten zellulären Kopplung und damit insgesamt mit stabileren Erregungsmustern einhergehen könnte (DHEIN 1992). Jedoch waren regionale Unterschiede der Dispersion auszumachen. Die Dispersion der vorderen Herzwand sank massiv, während bei der rechten Herzwand eine leichte Zunahme der Dispersion verzeichnet wurde (s. Anhang 2, Abb. 16). Dies könnte in einem Teil des Herzens möglicherweise in einer verbesserten und im anderen Teil in einer verschlechterten Zellkopplung resultieren und damit im gesamten Herzen proarrhythmische Auswirkungen haben. Regionale Unterschiede konnten auch bei der Gesamtaktivierungszeit beobachtet werden. Die Aktivierungszeit der hinteren Herzwand wurde am deutlichsten verzögert und barg damit ein

proarrhythmisches Potential. Die Wellenlänge blieb unverändert und die Ähnlichkeit der Vektorfelder und der Erregungsursprungspunkte sank nicht unter die Grenze von 10 % bzw. 50 %. Um einen direkten Vergleich zu der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion zu ziehen, wird dieser direkt im Anschluss besprochen. Die Auswirkungen der Methanol-löslichen Fraktion auf die Arrhythmie Modelle werden unter Einbeziehung der Ergebnisse der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion nachfolgend diskutiert.

5.3.4 Wirksamkeit der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion

Die Reduktion des Kalium-Gehalts der Methanol-löslichen Fraktion erfolgte mit einem Kationenaustauscher um das 3-fache (s. 3.6.3). Dadurch wurde direkt am Herzen der Kaliumgehalt von ca. 1,2 mmol/l auf ca. 0,4 mmol/l reduziert. Diese in der Medizin gebräuchliche Methode erwies sich auch in der hier vorliegenden Arbeit als positiv, jedoch war ein hoher Verlust an Inhaltsstoffen zu verzeichnen. Möglicherweise wäre der Verlust geringer, wenn der Kationenaustauscher als Säulenmaterial im Rahmen einer Säulenchromatographie eingesetzt werden würde. Durch den ständigen Lösungsmittelfluss könnten nicht gebundene Inhaltsstoffe besser herausgespült werden als dies bei der in dieser Arbeit angewandten Methode der Fall war. Anhand dieser Versuche konnte festgestellt werden, inwieweit Kalium für die kardialen Effekte verantwortlich war (s. 4.4). Es wurden 2,16 mg/ml und 3,59 mg/ml Extrakt eingesetzt. Der Vergleich mit der Methanol-löslichen Fraktion bezieht sich auf die niedrigere Konzentration, da die Methanol-Fraktion bei 3,59 mg/ml einen Herzstillstand auslöste und deshalb einige Parameter nicht zur Verfügung standen (s. 4.1.7.2). Hauptmerkmal war, ohne weitere Parameter zu betrachten, dass bei der hohen Konzentration durch die Kalium-reduzierte Fraktion kein Herzstillstand ausgelöst werden konnte. Unter Betrachtung geschwindigkeitsbestimmender Parameter zeigte sich, dass die Verlangsamung der Gesamtaktivierungszeit sowie der epikardialen Geschwindigkeit und die erhöhte Dauer des QRS-Komplexes sowie der PQ-Zeit unter der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion nicht beobachtet werden konnten. Eine Hyperkaliämie führt zu kardialen Symptomen, da erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentrationen depolarisierende Effekte aufweisen. Dies wird durch einen verringerten Konzentrationsgradienten an Zellmembranen begründet, der zwar zu einer verminderten Distanz zum Schwellenpotential führt. Gleichzeitig jedoch werden die Natrium-Kanäle inaktiviert, so dass die Aufstrichgeschwindigkeit reduziert und keine Übererregbarkeit induziert wird (SCHIPPERHEYN 1984; NYGREN u. GILES 2000; SEJERSTED u. SJØGAARD 2000). Mit zunehmender Verbreiterung des QRS-Komplexes steigt infolge der langsamen Leitungsgeschwindigkeit die Wahrscheinlichkeit eines Herzstillstandes (ANON. 2005 a). Durch die zusätzliche Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit für den Inward rectifier (Einwärtsstrom des Kalium-Kanals), der für den Erhalt des Ruhemembranpotentials

zuständig ist, werden die Plateau-Phase der Aktionspotentiale und damit die Aktionspotentialdauer verkürzt (PATERSON 1996). Die oben genannten Veränderungen waren somit sehr wahrscheinlich auf den Einfluss der hohen Kalium-Konzentration der Methanol-löslichen Fraktion zurückzuführen, die direkt am Herzen eine Konzentration von ca. 1,2 mmol/l aufwies. Auch die massive Erhöhung des relativen Koronarflusses um 152 % unter der Methanol-löslichen Fraktion war teilweise auf das Kalium zurückzuführen, da Kalium vasodilatierende Eigenschaften besitzt (PATERSON 1996). Bei der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion konnte ebenfalls eine Erhöhung des relativen Koronarflusses errechnet werden. Da die Kalium-Konzentration dieser Fraktion im Herzen bei ca. 0,4 mmol/l lag, war die Koronarflusserhöhung vermutlich auf eine Blockade von Kalzium-Kanälen zurückzuführen. Die Bradykardie war unter der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion vorhanden (+7 %), jedoch nicht so ausgeprägt wie unter der Methanol-löslichen Fraktion (+152 %) (s. Abb. 37). Deshalb resultierte die Bradykardie der Kalium-reduzierten Fraktion nur anteilig aus der Hyperkaliämie und könnte möglicherweise ebenso auf eine Kalzium-Kanal antagonisierende Eigenschaft zurückgeführt werden. Auch eine negative Inotropie wurde durch die Kalium-reduzierte Fraktion induziert, so dass diese Parameter die Vermutung, dass eine Kalzium-Kanal blockierende Komponente in der Fraktion enthalten ist, festigten. Die Hypothese, dass die Fraktion einen blockierenden Mechanismus repolarisierender Kalium-Kanäle aufwies, konnte durch die Erhöhung der ST-Hebung um 8 % untermauert werden. Sotalol bewirkte zum Vergleich eine Erhöhung um 23 % und die Antiarrhythmika der anderen Klassen besaßen keinen Einfluss auf diesen Parameter (DHEIN 1992). Außerdem konnte unter dem Einfluss der Kalium-reduzierten Fraktion ein Anstieg der lokalen Potentialdauer und eine Verminderung der Dispersion von ARI verzeichnet werden, die sich potentiell antiarrhythmisch auswirken könnten. Die regionalen Unterschiede waren im Gegensatz zur Methanol-löslichen Fraktion nicht ausgeprägt und verwiesen damit auf ein geringeres proarrhythmisches Risiko als bei der Methanol-löslichen Fraktion. Ein weiterer antiarrhythmischer Effekt sowie Hinweis auf eine Kalium-Kanal-Blockade war, im Gegensatz zur Methanol-löslichen Fraktion, die Verlängerung der Wellenlänge um 21 %, die bei herkömmlichen Antiarrhythmika nur durch Sotalol um 23 % gedehnt wurde (DHEIN 1992). Torsade-de-Points Arrhythmien, ausgelöst durch eine verlängerte Wellenlänge, wurde in keinen Versuchen beobachtet. Essentiell für den Erhalt der Erregungsgeometrie war die geringe Verminderung der Ähnlichkeit der Erregungsursprungspunkte (-29 %) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Die Vektorfeldähnlichkeit wurde stärker reduziert als die BTP-Ähnlichkeit, fiel jedoch nicht unter die proarrhythmische Grenze. Dies ist ein sehr wichtiges Kriterium für ein potentielles Antiarrhythmikum, da einer Arrhythmie ein Zerfall der Erregungsgeometrie vorausgeht (DHEIN et al. 1990; DHEIN 1992). Sotalol als Vergleich, ein Klasse III Antiarrhythmikum (s.

2.3.5), beeinflusste die Geometrie der Erregungsleitung und –ausbreitung ebenfalls kaum bis gar nicht. Da diese Parameter unter der Methanol-löslichen Fraktion stärker vermindert wurden, ist anzunehmen, dass einem durch die Hyperkaliämie bedingten Herzstillstand ebenfalls ein Zerfall des Erregungsmusters vorausging. Bei einer Dosierung von 2,16 mg/ml waren die regionalen Unterschiede bei der Kalium-reduzierten Fraktion gering. Wurde die Fraktion mit einer Konzentration von 3,59 mg/ml infundiert, so konnten deutliche Unterschiede zwischen den Herzregionen ausgemacht werden. Das ließ vermuten, dass die Dosierung mit 2,16 mg/ml in einem therapeutischen Fenster lag und 3,59 mg/ml schon proarrhythmische und z. T. therapeutisch keine günstigen Effekte aufwies. Insgesamt zeigte sich die Kalium-reduzierte Fraktion auf Grund der Wirkungen therapeutisch vielversprechend.

Die bislang beschriebenen kardialen Wirkungen und antiarrhythmischen Effekte beweisen, dass *Leonurus cardiaca* tatsächlich herzwirksam ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit basiert die Wirksamkeit auf einem gekoppelten Kalium- und Kalzium-Kanal Antagonismus sowie einem schwachen Natrium-Kanal-Antagonismus. Die Parameter der Leitungsgeschwindigkeit wurden überwiegend durch die hohen extrazellulären Kalium-Konzentrationen in der Methanol-löslichen Fraktion und nur wenig durch eine Natrium-Kanal-Blockade bedingt. Welche Substanz(en) für diese Wirkung verantwortlich war(en) ist nicht bekannt und erfordert eine weitere Fraktionierung der Kalium-reduzierten Fraktion. Im Patch-Clamp-Verfahren konnte die Annahme eines Kalium- und Kalzium-Kanal Antagonismus bestätigt werden. Des Weiteren wurde eine geringfügige Natrium-Kanal-Blockade beobachtet (DHEIN, persönliche Mitteilung, Juni 2005).

5.4 Arrhythmie Modelle

Alle Arrhythmie Modelle wurden mit der Methanol-löslichen Fraktion durchgeführt, da die zusätzlichen Wirkungen des Kaliums erst in den später stattfindenden In-vivo -Versuchen festgestellt wurden. Es wird im Folgenden jedoch versucht, die möglichen Auswirkungen des Kaliums abzuwägen und die Ergebnisse der Arrhythmie Modelle zu skizzieren.

5.4.1 Prophylaktischer Ansatz

Die elektrische Stimulation des Herzens wurde gewählt, um sowohl Veränderungen der Reizschwelle als auch der Leitungsgeschwindigkeiten in longitudinaler und transversaler Richtung zu untersuchen. Als Referenzsubstanzen dienten Ajmalin und Palmitoleinsäure (s. 4.2.1).

Die Reizschwelle bestimmt die Grenze, oberhalb derer ventrikuläre Extrasystolen initiiert werden können (DHEIN et al. 2005 b). Unter dem Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion

konnte eine mehr als 10-fache Erhöhung der Reizschwelle als unter Ajmalin und Palmitoleinsäure verzeichnet werden. Eine Applikation der Fraktion erwies sich daher als eine wahrscheinlich sinnvolle Prophylaxe gegenüber Arrhythmien, bedarf aber bei einer Langzeitapplikation noch weiterer Untersuchungen. Die Kalkulation der transversalen und longitudinalen Leitungsgeschwindigkeit zeigte, dass Ajmalin, wie zu erwarten, die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit verlangsamte und durch die Palmitoleinsäure nicht beeinflusst wurde (s. Abb. 30). Die Methanol-lösliche Fraktion zeigte eine stärkere Reduktion der longitudinalen Leitungsgeschwindigkeit als das Ajmalin und wies damit auf eine Natrium-Kanal-blockierende Eigenschaft hin. Inwiefern der hohe Kalium-Gehalt der Methanol-löslichen Fraktion die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit beeinflusste, ist spekulativ. Da jedoch am isolierten Herzen die geschwindigkeitsbestimmenden Parameter nach der Kalium-Reduktion von der Fraktion nicht mehr beeinflusst wurden, könnte die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit zu großen Anteilen durch das Kalium beeinträchtigt worden sein. Die transversale Geschwindigkeit wurde durch die Palmitoleinsäure als Gap Junction-Blocker deutlich reduziert. Aber auch unter Ajmalin zeigte sich eine wenn auch im Vergleich zur Palmitoleinsäure gemäßigte Verlangsamung. Die Methanol-lösliche Fraktion minderte die transversale Leitungsgeschwindigkeit nur geringgradig. Somit war anzunehmen, dass die Methanol-lösliche Fraktion keine Gap Junctions blockierte und diese durch das Kalium nicht beeinträchtigt wurden.

5.4.2 Therapeutischer Ansatz

5.4.2.1 Isoprenalin

Zur Untersuchung β -blockierender Eigenschaften der Methanol-löslichen Fraktion wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit Isoprenalin sowie mit Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion durchgeführt (s. 4.2.2). Die Hauptwirkung des Isoprenalins, eine positive Inotropie, wurde durch die Fraktion nicht beeinflusst, die Erregungsleitungsgeschwindigkeiten durch die Fraktion unabhängig vom Isoprenalin verlangsamt. Somit konnte vermutlich ein unabhängiger Antagonismus beider Substanzen festgestellt werden. Typisch für einen unabhängigen Antagonismus ist der Erhalt einer identischen Kurve, da der Netto-Effekt des Isoprenalins, die positive Inotropie, durch die Wirkung der Methanol-löslichen Fraktion nicht beeinträchtigt wurde (s. Abb. 32). Die bradykarde Wirkung der Fraktion überlagerte jedoch das Isoprenalin. Dies wird bei Wirkstoffen festgestellt, die unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen. (DHEIN et al. 2005 a). Obwohl der hohe Kalium-Gehalt der Methanol-löslichen Fraktion vermutlich verantwortlich für die Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit war, blieb die positiv inotrope Wirkung des Isoprenalins durch die negativ

inotrope Fraktion unbeeinflusst. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Methanol-lösliche Fraktion keine β -blockierende Eigenschaften besitzt.

5.4.2.2 Aconitin-bedingte monomorphe ventrikuläre Tachykardie

Bevor die In-vivo -Versuche den massiven Einfluss des Kaliums verdeutlichten, wurde die Verlangsamung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit auf eine mögliche Natrium-Kanal-Blockade zurückgeführt. Deshalb wurde mit Aconitin, das die Inaktivierung von Natrium-Kanälen verhindert, eine monomorphe ventrikuläre Tachykardie ausgelöst (s. 4.2.3). Es entwickelte sich ein Erregungskreislauf im Arbeitsmyokard und nicht, wie physiologischerweise, durch das His-Purkinje-Bündel. Demzufolge ließ sich begründen, dass unter Aconitin die Gesamtaktivierungszeit verlangsamt wurde. Die lokale Ausbreitungsgeschwindigkeit, repräsentiert durch die Peak-to-Peak Amplitude, war beschleunigt, da durch den verlängerten Natrium-Influx die longitudinale Ausbreitungsgeschwindigkeit stieg und damit die Amplitude des QRS-Komplexes zunahm. Je größer diese Amplitude ist, desto schneller ist die Leitungsgeschwindigkeit. Durch die Methanol-lösliche Fraktion wurden sowohl die Herzfrequenz und die lokale Ausbreitungsgeschwindigkeit verlangsamt als auch die Gesamtaktivierungszeit verzögert. Auch die Erhöhung der PQ-Zeit, der ST-Hebung und des relativen Koronarflusses durch die Fraktion zeigten, dass die Methanol-lösliche Fraktion Aconitin antagonisieren konnte. Da die Kalium-reduzierte Fraktion die Frequenz nur geringgradig und die Gesamtaktivierungszeit gar nicht beeinflusste, ist vermutlich ein großer Teil des Aconitin-Antagonismus durch die Methanol-lösliche Fraktion auf Kalium zurückzuführen, da eine Hyperkaliämie zu Depolarisation und damit zur Inaktivierung von Natrium-Kanälen führt (SCHIPPERHEYN 1984; NYGREN u. GILES 2000; SEJERSTED u. SJØGAARD 2000). Auch die Verminderung der Peak-to-Peak Amplitude wurde wahrscheinlich teils durch Kalium bedingt, da die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion diese nicht veränderte. Jedoch ist eine Natrium-Kanal-Blockade seitens der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion, die mittels der Patch-Clamp-Technik verifiziert wurde, mitverantwortlich für den Antagonismus. Die Durchführung dieses Arrhythmie-modells mit der Kalium-reduzierten Fraktion wäre aufschlussreich, um das Ausmaß der Natrium-Kanal-Blockade erfassen zu können. Während des wash outs kehrte die monomorphe ventrikuläre Tachykardie wieder, so dass die Irreversibilität der Aconitinvergiftung, die in der Literatur beschrieben wurde (HONERJÄGER 1982; HONERJÄGER u. MEISSNER 1983), bestätigt werden konnte.

5.5 In-vivo -Versuche

Der im Voraus durchgeführte Herzultraschall sicherte die Organgesundheit der Kaninchen. Die Regelmäßigkeit des EKGs wurde unterstützend hinzugezogen und insgesamt konnten

keine auffälligen Organveränderungen diagnostiziert werden. Die Narkosetiefe wurde anhand eines positiven Licht- und Korneareflex überprüft und gewährleistete die Konstanz der Tiefe der Inhalationsnarkose. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Methanol-lösliche Fraktion und der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion erläutert.

5.5.1 Beeinflussung des Blutdrucks und der Herzmechanik unter *Leonurus cardiaca*

Unter dem Einfluss beider Fraktionen konnte bei einer Applikation von 2 ml/min ein Abfall des Blutdrucks und der Herzfrequenz festgestellt werden, der durch eine sympathische Gegenregulation kompensiert wurde (s. 4.3). Bei der Kalium-reduzierten Fraktion nahm die sympathische Gegenregulation überhand und resultierte in einer moderaten Zunahme von Herzfrequenz und Blutdruck. Dies ließ auf einen bradykardisierenden und vasodilatierenden Wirkmechanismus schließen, der durch die Testung der Kalium-reduzierten Fraktion am isolierten Herzen untermauert werden konnte. Im Gegensatz zur Kalium-reduzierten Fraktion bewirkte der Kalium-Gehalt der Methanol-löslichen Fraktion eine letale Hyperkaliämie, die durch den Anstieg der systemischen Kalium-Konzentration im Blut nachgewiesen wurde. Der Tod der Tiere basierte unter dem Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion vermutlich auf einem durch die Hyperkaliämie entstandenen Herzstillstand und möglichen peripheren Vasodilatation. Ersteres spiegelte damit den Herzstillstand am isolierten Herzen wider und letzteres konnte durch den abfallenden Blutdruck gefestigt werden.

5.5.2 Zentralnervöse Auswirkungen von *Leonurus cardiaca*

Das EEG ist eine Methode zur Messung elektrischer Gehirnströme, indem die Spannungsschwankungen des Gehirns abgeleitet werden. Beim EEG unterscheidet man Alpha-, Beta-, Theta- und Deltawellen. Betawellen treten im Wachzustand, Alphawellen bei leichter Entspannung, Thetawellen bei tiefer Entspannung und Deltawellen im Tiefschlaf auf (PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH 1998 b). Die Methanol-lösliche Fraktion erzeugte bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 2 ml/min eine Nulllinie. Die Kalium-reduzierte Fraktion bewirkte vorwiegend Deltawellen im EEG (s. 4.3.3). Somit konnte vermutet werden, dass beide Fraktionen zentralnervös wirksam waren. Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Elektrolytverschiebungen treten bei der Hyperkaliämie jedoch keine zerebralen Symptome auf, da die Blut-Hirn-Schranke für Kaliumionen relativ schlecht permeabel ist (ANON. 2005 a). Der Effekt der Methanol-löslichen Fraktion war deshalb z.T. wahrscheinlich auf das Versacken des Blutes in der Peripherie sowie auf den Herzstillstand zurückzuführen, da das Gehirn mit Sauerstoff und Nährstoffen unterversorgt wurde. Sowohl der Licht- als auch der Korneareflex fielen bei 2 ml/min negativ aus. Die oben beschriebenen Veränderungen deuteten zusätzlich auf eine zunehmende Narkosetiefe und festigten die

Vermutung einer zentralnervösen Wirkung. Somit konnten die in der Literatur beschriebenen, durch *Leonurus cardiaca* bedingten, zentralnervösen Effekte bei Ratten, Kaninchen und Menschen (SWEREW 1931; ORLANDI 1950; MILKOWSKA-LEYCK 2002) in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (s. 2.1.3). Die von ORLANDI 1950 durchgeführte Studie an Kindern, die an *Pater nocturnus*, Erethismus, Tachykardien und posttraumatischen Angstzuständen litten, zeigte eine deutliche verbesserte Symptomatik. Dies festigt die Hypothese einer sedierenden, zentralnervösen Fraktionswirkung bei zeitgleicher Kalium- und Kalzium-Blockade des Herzens. PATER (1933) und POTLOG (1936) empfahlen die Anwendung von *Leonurus cardiaca* bei Epilepsie. Antiepileptika sind Substanzen, die inner- und außerhalb der Zellen das Fließgleichgewicht der Ionen beeinflussen und damit die Anfallsneigung der Hirnnervenzellen herabsetzen (WIESER u. JALLON 2002). Beim Tier wird überwiegend Phenobarbital eingesetzt (KORNBERG 2001). Barbiturate wirken sedativ/hypnotisch, narkotisch und antikonvulsiv (UNGEMACH 2006). Da beide Fraktionen zentralnervös wirksam waren, wäre ein Einsatz der Fraktionen bei Epilepsie denkbar, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

5.6 HPLC und DC

Mittels der Dünnschichtchromatographie und der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie wurden die Inhaltsstoffe der Extrakte/Fraktionen von *Leonurus cardiaca* aufgetrennt und dargestellt (s. 4.5). Welche Stoffe enthalten waren und welche für die kardiale und zentralnervöse Wirkung verantwortlich waren, war unbekannt. Beide Methoden dienten lediglich als Übersicht, einen Vergleich für Folgearbeiten zu ermöglichen. Eine weitere Fraktionierung und Isolierung der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion wäre wichtig, da die Reinsubstanz(en) medizinisch, gemäß der in dieser Arbeit veranschaulichten Wirkungen, von großer Relevanz sein könnte(n). Die Referenzsubstanzen der Dünnschichtchromatographie dienten lediglich als Orientierung, ermöglichten aber nicht einen direkten Rückschluss auf die Art der Substanzen der Fraktionen.

5.7 Schlussfolgerung

Da das *Leonurus*-Kraut als Tee aufgekocht und getrunken wird, ist zu vermuten, dass die im Soxhlet-Extrakt gefundenen und bis zur Kalium-reduzierten Fraktion verfeinerten Wirkprinzipien möglicherweise die gleichen wie im Tee sind, da die Art der Extraktion gleich ist. Die Gefahr der Hyperkaliämie stellt sich durch die Verabreichung als Tee nicht, da die Magen-Darm-Schranke einer Hyperkaliämie vorbeugt. Anhand der in dieser Arbeit aufgeführten Parameter, kann die Aussage von ERSPAMER (1948), die Herzwirksamkeit von *Leonurus cardiaca* basiere ausschließlich auf Kalium, widerlegt werden. POLACCI (1948) führte die kardiotonische Aktivität von *Leonurus cardiaca* auf die in der Pflanze

enthaltenen Glykoside zurück. Herzglykoside senken normalerweise die Herzfrequenz, verlängern das PQ-Interval und verkürzen das QT-Interval (HAHN et al. 1982). Da in der hier vorliegenden Arbeit die Bradykardisierung des Herzens nur geringgradig, die PQ-Zeit nicht beeinflusst und die QT-Zeit verlängert wurde, kann die Hypothese von Polacci entkräftet werden. MILKOWSKA-LEYCK et al. zeigten 2002, dass Lavandulifoliosid aus *Leonurus cardiaca* bei Mäusen und Ratten negativ chronotrop, geringgradig hypotensiv wirkte und das PQ- und QT-Intervall verlängerte. Die Wirkungen der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion wiesen dagegen eine negative Inotropie, deutliche blutdrucksenkende Auswirkungen und keine Beeinträchtigung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit auf. Folglich war das Lavandulifoliosid sehr wahrscheinlich nicht die wirksame Komponente, die die kardialen Effekte in der hier vorliegenden Arbeit bewirkten.

Da *Leonurus cardiaca* als Tee verabreicht wird und im Tee auch Kalium enthalten ist, basiert möglicherweise der Anwendungserfolg in der Volksmedizin auf der Prophylaxe der Hypokaliämie. Eine Hypokaliämie kann zu Extrasystolen und schließlich zu Arrhythmien führen. Wird mit dem Tee ausreichend Kalium aufgenommen, kann dieser Arrhythmie-ursache vermutlich vorgebeugt werden.

Die Wirkstoffe sind, entgegen der gängigen Meinung (REUTER u. DHIEL, 1969), sehr stabil, da sie in der hier vorliegenden Arbeit im Soxhlet-Apparat mehrere Stunden erhitzt wurden. Interessant wäre ein Vergleich von Baldrian und *Leonurus cardiaca*, da MAD AUS (1938) und ROMANOWSKI (1959) feststellten, dass *Leonurus cardiaca* eine stärkere Wirkung sowohl auf das zentrale Nervensystem als auch auf das Herz besitzen soll. Da in der hier vorliegenden Arbeit am EEG eine Verschiebung der Wellen zum δ -Rhythmus (Vorkommen im Tiefschlaf) und eine Unterdrückung des α -Rhythmus (Vorkommen im Wachzustand) registriert wurde, konnten die Ergebnisse von MAD AUS (1938) und ROMANOWSKI (1959) in dieser Arbeit bestätigt werden. Baldrian ist ein anerkanntes Beruhigungsmittel, das als Sedativum bei Unruhe und nervös bedingten Einschlafstörungen eingesetzt wird (PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH 1998 c). Als Tee werden 2 - 3 g Droge aufgekocht und ist damit mengenmäßig mit der Dosierung von *Leonurus cardiaca* vergleichbar (s. 2.2.1.2).

5.8 Indikation

Die in der hier vorgelegten Arbeit beschriebenen kardialen Wirkungen von *Leonurus cardiaca* besitzen ein hohes antiarrhythmisches Potential: Zum einen durch die Erhöhung der Reizschwelle und zum anderen durch die positive Beeinflussung der durch DHEIN 1992 charakterisierten proarrhythmischen Potentiale.

Die Behandlung der koronaren Herzkrankheit, welche beim Menschen durch Plaqueablagerungen verursacht wird, erfolgt mit Antiarrhythmika der Klasse III. Diese verlängern die Aktionspotentialdauer und beugen somit Arrhythmien vor. Die Angina pectoris, das Symptom einer akuten Koronarinsuffizienz, wird dagegen mit Vasodilatoren und Antiarrhythmika der Klasse IV behandelt. Ziel ist eine Erweiterung der Koronargefäße und ein verminderter, kardialer Sauerstoffbedarf (s. 2.3.1). *Leonurus cardiaca* erzeugt vergleichbare Wirkungen wie die der Antiarrhythmika der Klassen III und IV. Durch die Kalzium-Kanal-Blockade bewirkt *Leonurus cardiaca* zum einen eine Vasodilatation der Koronargefäße. Zum anderen führt die daraus resultierende negative Inotropie zu einem verminderten Sauerstoffbedarf. Die Blockade von Kalium-Kanälen bewirkt eine Aktionspotentialverlängerung und erhöht das antiarrhythmische Potential von *Leonurus cardiaca*. Da diese Pflanze mehrere Wirkungen in sich vereint, wäre in Zukunft nur eine Monotherapie der koronaren Herzkrankheit möglich. Zusätzlich weist *Leonurus cardiaca* im Gegensatz zu herkömmlichen Antiarrhythmika ein hohes antiarrhythmisches Potential auf. Die Anwendung von *Leonurus cardiaca* bei der koronaren Herzkrankheit und bei der Angina pectoris ist denkbar, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) der Katze ist meist die Folge einer Hyperthyreose, aber auch Bluthochdruck und eine Aortenstenose können die Ursache sein (s. 2.3.2). Muskuläre Steifigkeit, eine daraus resultierende kardiale Minderperfusion sowie ein erhöhtes Vorkommen von β -Rezeptoren mit einhergehender Sinustachyarrhythmie charakterisieren die HCM der Katze. Neben der Therapie der Grunderkrankung werden üblicherweise ACE-Hemmer, Furosemid, β -Blocker und Kalzium-Kanal-Blocker eingesetzt. Die *Leonurus cardiaca* weist blutdrucksenkende, vasodilatatorische und geringgradige bradykardisierende Eigenschaften auf, blockiert jedoch keine β -Rezeptoren. Ein therapeutischer Einsatz bei der HCM ist daher vermutlich nur partiell möglich. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die bradykardisierende Eigenschaft von *Leonurus cardiaca* ausreicht, einer Sinustachyarrhythmie entgegenzuwirken oder ob *Leonurus cardiaca* in Kombination mit β -Rezeptor-Blockern eingesetzt werden muss.

Die Magendrehung beim Hund ist eine Notfallsituation und bedarf eines schnellen chirurgischen Eingriffs (s. 2.3.3). Hypovolämie, Azidose und ein Endotoxin-Schock bewirken eine Minderperfusion und eine Schädigung des Herzmuskels sowie anderer Organe. Arrhythmien mit ventrikulären Extrasystolen sind die Folge und werden mit Lidocain, einem Natrium-Kanal-Blocker, therapiert. Der Einsatz von *Leonurus cardiaca* ist bei dieser Herzrhythmusstörung nicht sinnvoll, da *Leonurus cardiaca* nur eine geringgradige Blockade von Natrium-Kanälen bewirkt. Zwar könnte die Kalium-Kanal-Blockade die Arrhythmie über

eine Aktionspotentialverlängerung vermindern, jedoch ist dies meist nicht ausreichend. Die Anwendung von *Leonurus cardiaca* ist daher bei dieser Form der Rhythmusstörung vermutlich nicht indiziert.

Bei der Belastungsmiopathie des Schweins ist es wichtig, die stress-induzierte Tachykardie, durch die letztlich die biologischen Entgleisungen verursacht und forciert werden, zu verhindern (s. 2.3.4). Da *Leonurus cardiaca* in der hier vorliegenden Arbeit sedative Wirkungen aufwies (s. 4.3), kann möglicherweise das Stressempfinden der Schweine herabgesetzt werden und damit der Belastungsmiopathie entgegenwirken. Prinzipiell wäre daher ein prophylaktischer Ansatz zur Vorbeugung der Belastungsmiopathie durch eine orale Langzeitapplikation von *Leonurus cardiaca* denkbar. Auch wäre es denkbar, dass durch den Kalzium-Kanal-Antagonismus des Extrakts die Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum reduziert werden könnte, da das triggernde Kalzium durch die Kanal-Blockade fehlt bzw. minimiert wird. Dadurch könnten die Hyperkontraktionen und die daraus entstehende Hyperthermie sowie die metabolischen Entgleisungen möglicherweise begrenzt werden, so dass eine Belastungsmiopathie sich eventuell nicht voll entwickeln kann. Dies bedarf weiterer Untersuchungen.

Momentan ist *Leonurus cardiaca* von der deutschen Homöopathischen Union in 6 homöopathischen Kombinationspräparaten zur Anwendung beim Menschen registriert. Für Tiere ist zurzeit kein einziges *Leonurus cardiaca* enthaltendes Arzneimittel zugelassen. Der Einsatz von *Leonurus cardiaca* bei Mensch und Tier birgt interessante und vielfältige pharmazeutische Ansatzpunkte, wodurch möglicherweise die gängigen Therapien bei einigen Formen der Herzerkrankung vereinfacht und verbessert werden könnten.

6 Zusammenfassung

Kerstin Melichar

Leonurus cardiaca: Untersuchungen zur Wirksamkeit eines pflanzlichen Antiarrhythmikums am isolierten Kaninchenherzen.

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und der Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im April 2007

102 Seiten, 72 Abbildungen, 9 Tabellen, 150 Literaturangaben, 6 Anhänge

Schlüsselworte: Leonurus cardiaca, antiarrhythmisches Potential, Extraktfraktionierung, Langendorff-Apparatur, Herzrhythmusstörung

Die Pflanze Leonurus cardiaca wird seit Jahrhunderten in der Volksmedizin als Tee bei nervösen Herzbeschwerden angewendet. Bislang konnten wissenschaftlich keine eindeutigen Beweise erbracht werden, ob das Leonurus-Kraut kardial wirksam ist oder nur einen Placeboeffekt aufweist. In der hier vorliegenden Arbeit wurden aus dem Leonurus-Kraut drei verschiedene Extrakte unterschiedlicher Polarität hergestellt: ein wässriger Soxhlet-Extrakt, ein alkalisierter Chloroformextrakt und ein Ethanol/Wasser-Extrakt. Diese wurden am isolierten Kaninchenherzen an der Langendorff-Apparatur hinsichtlich kardialer Effekte getestet. Mittels eines Multi-Elektroden-Verfahrens konnte mit 256 Elektroden das extrazelluläre epikardiale Potential auf der Herzoberfläche abgegriffen und somit eine Aussage über Erregungsausbreitungsmuster und –geschwindigkeiten getroffen werden. Die weitere Fraktionierung eines kardial wirksamen und therapeutisch möglicherweise einsetzbaren Extrakts richtete sich nach dem Prinzip der Bioassay-guided-Fraktionierung unter Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel. Der Soxhlet-Extrakt zeigte Natrium-, Kalium- und Kalzium-Kanal-blockierende Tendenzen sowie eine potentiell antiarrhythmische Eigenschaft.

Die Fraktionen beeinflussten die gleichen elektrophysiologischen und funktionellen Parameter wie der Ausgangsextrakt, zeigten jedoch eine deutlich stärkere Ausprägung auf

das Herz. Die Präzipitation der wässrigen Fraktion kann als Schritt zur Trennung von Wirkprinzipien gesehen werden, wobei das Präzipitat alle Parameter irreversibel veränderte und zum Versagen des Herzens führte. Die Methanol-lösliche Fraktion charakterisierte sich dagegen durch eine massive Verlängerung der frequenzkorrigierten Potentialdauer (QTc) bis teilweise zum Herzstillstand, eine Reduktion der linksventrikulären Kontraktionskraft (LVP) sowie eine Erhöhung des Koronarflusses (CF). Auch eine deutliche Verlängerung der PQ-Zeit, des QRS-Komplexes sowie der Gesamtaktivierungszeit wurden festgestellt. Während des wash outs zeigte sich die vollständige Reversibilität der funktionellen und elektrophysiologischen Parameter mit der Wiederherstellung eines stabilen Sinusrhythmus.

Zur Abschätzung antiarrhythmischer Wirkungen und zur Erstellung eines mutmaßlichen Wirkprofils wurde die Methanol-lösliche Fraktion in drei Arrhythmie modellen getestet. β -blockierende Eigenschaften konnten nicht nachgewiesen werden. Mittels elektrischer Stimulation konnte eine Reizschwellenverschiebung um das 10-fache festgestellt werden. Eine Aconitin-bedingte monomorphe ventrikuläre Arrhythmie wurde durch die Methanol-lösliche Fraktion antagonisiert. Damit kann auf eine Natrium-Kanal-blockierende Eigenschaft der Fraktion geschlossen werden. Die Blockade von Gap Junctions wurde nicht festgestellt.

In vivo wurden an leicht narkotisierten Kaninchen mögliche zentralnervöse und sedative Eigenschaften mittels EEG untersucht. Dabei wurde ein hoher Kaliumgehalt des Extrakts festgestellt, der in vivo letal war. Zum Ausschluss rein Kalium-bedingter Extraktwirkungen wurde der Kaliumgehalt reduziert und erneut in vivo getestet. Der Übergang von Alpha- zu Deltawellen (Tiefschlaf) im EEG wurde dokumentiert, wodurch eine zentralnervöse Wirkung der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion vermuten werden kann.

Um ausschließlich kardiale Effekt zu untersuchen, wurde die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion zusätzlich am isolierten Kaninchenherzen geprüft. Die geschwindigkeitsbestimmenden, kardialen Parameter (BCL, TAT, PQ, QRS) wurden durch die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion nicht beeinflusst und auch kein Herzstillstand ausgelöst. Die Effekte basieren vermutlich auf einer Kalium- und Kalzium-Kanal-Blockade mit einem hohen antiarrhythmischen Potential. Die Beeinflussung geschwindigkeitsbestimmender Parameter, die Verzögerung der longitudinalen Ausbreitungsgeschwindigkeit bei elektrischer Stimulation und der Aconitin-Antagonismus wurden somit überwiegend durch die hohen Kaliumkonzentrationen der Methanol-löslichen Fraktion bedingt. Die in dieser Arbeit beschriebenen kardialen Wirkungen und antiarrhythmischen Effekte beweisen, dass *Leonurus cardiaca* tatsächlich herzwirksam ist. Ein Einsatz von *Leonurus cardiaca* bei Herzrhythmusstörungen bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

7 Summary

Kerstin Melichar

Leonurus cardiaca: Investigation of potency of a herbal antiarrhythmic agent in isolated rabbit heart.

Institute for Pharmacology, Pharmacy and Toxicology of the Veterinary Faculty of the University of Leipzig and Clinic for Cardiac Surgery, Heart Center Leipzig, Medical Faculty of the University of Leipzig

Submitted in April 2007

102 Pages, 72 pictures, 9 tables, 150 data of literature, 6 appendices

Key words: *Leonurus cardiaca*, antiarrhythmic potential, fractioning of extracts, Langendorff-apparature, cardiac rhythmic disturbances

The herb *Leonurus cardiaca* has been used as traditional medicine for nervous heart disorders for centuries. So far there has been no experimental proof as to whether *Leonurus* is effective in cardiac disorders or simply acts as a placebo. In this study three extracts of *leonurus cardiaca* with different polarity were prepared: an aqueous soxhlet-extract, an alkalised chloroform-extract and an ethanol/water-extract. These preparations were tested for their cardiac effects on isolated rabbit hearts using a langendorff-apparatus. With a multi-electrode-array the extracellular epicardial potential was determined by 256 electrodes placed on the surfaced heart allowing the measurement of distribution and speed of the excitation patterns. A further fractionation of a cardiac-effective and possibly therapeutic useful extract, using different organic solvents, was performed according to the principle of bioassay-guided-fractioning. The soxhlet-extract showed tendencies for a blockage of sodium-, potassium and calcium-channels as well as a potential antiarrhythmic quality.

In comparison to the original extract the fractions more strongly influenced the electrophysiological and functional cardiac parameter. The precipitation of the aqueous fraction allowed the separation of different modes of action. The precipitate caused

irreversible changes of all parameters inducing heart failure. The effect of the methanol-soluble fraction was characterised by a severe elongation of the frequency-corrected potential period (Qtc) until cardiac arrest, a reduction of the left ventricular pressure (LVP) as well as an increase of the coronary flow. In addition a distinct elongation of PQ-time, QRS-complex as well as the total activation time (TAT) were determined. A complete reversibility of functional and electrophysiological parameter with reconstitution of a stable sinus rhythm was shown during the wash out period.

In order to estimate antiarrhythmic effects and for an estimation of a presumed drug profile investigation of three antiarrhythmic models were carried out. There were no β -blocking properties. Programmed electrical stimulation revealed a ten-fold increase in stimulation threshold. An aconitin-related monomorphic ventricular arrhythmia could be antagonised by the methanol-soluble fraction. Thus, sodium-channel-blocking properties of the fraction could be assumed. An uncoupling of gap junctions could not be demonstrated.

Potential central nervous and sedative properties were examined in vivo using EEG measurements in rabbits receiving light anaesthesia. A high content of potassium in the extract was found, which was lethal in vivo. For an exclusion of solely potassium-related effects of the extract the potassium content was reduced and tested in vivo again. The transition from alpha- to delta-waves (deep sleep) was documented with EEG, indicating that a central nervous effect of the methanol-soluble fraction was present.

The potassium-reduced methanol-soluble extract was additionally examined in isolated rabbit hearts. Speed-related, cardiac parameter (BCL, TAT, PQ, QRS) were not influenced by the potassium-reduced methanol-soluble fraction and no cardiac arrest could be caused. The effects were likely to be based on a blockage of potassium and calcium-channels with a high antiarrhythmic potential. The effect on speed-related parameter, the delay of the distribution of the longitudinal speed by the electrical stimulation and the antagonism of aconitin were mainly caused by the high potassium content of the methanol-soluble fraction and less by a blockage of sodium channels. The cardiac and antiarrhythmic effects described in this study prove that *Leonurus cardiaca* is cardioactive. However, the use of *Leonurus cardiaca* in cardiac arrhythmic disorders warrants further investigations.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adam KP: Analytik biogener Arzneimittel. 4. Auflage. Becker H, Herausgeber. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2001.
2. Adaniya H, Hayami H, Hiraoka M, Sawanabori T. Effects of magnesium on polymorphic ventricular tachycardias induced by aconitine. J Cardiovasc Pharmacol. 1994;24(5):721-9.
3. Anonym 2005 a. Physiologie und Pathophysiologie des Kalium-Haushaltes. s. Internet-Literaturverzeichnis.
4. Anonym 2005 b. Motherwort. s. Internet-Literaturverzeichnis.
5. Anonym 2005 c. Leonurus cardiaca. s. Internet-Literaturverzeichnis.
6. Arisi G, Macchi E, Baruffi S, Spaggiari S, Taccardi B. Potential field on the ventricular surface of the exposed dog heart during normal excitation. Circ Res. 1983;52:706-15.
7. Balansard J. Sur quelques Labiées. Bull Sci Pharmacol. 1936;43:48.
8. Barry W, Bridges J. Intracellular calcium Homeostasis in cardiac myocytes. Circulation. 1993;87:1806-15.
9. Bauer R, Khan I, Wagner H. Echinacea-Drogen-Standardisierung mittels HPLC und DC. Deutsche Apotheker Zeitung. 1986;126(20):1065-70.
10. Bauer R, Remiger P, Wagner H. Vergleichende DC- und HPLC-Analyse der Herba-Drogen von Echinacea purpurea, E. pallida und E. angustifolia. Deutsche Apotheker Zeitung. 1988;128(4):174-80.
11. Bohn FK. Klinischer Beitrag zur ventrikulären Extrasystolie mit fixer Kopplung; Eine Studie bei Hunden. Tierärztl Umschau. 2001;56:75-79.

12. Bojorges R, Pastelin G, Sanchez-Perez S, Mendez R, Kabele E. The effects of ajmaline in experimental and clinical arrhythmias and their relation to some electrophysiological parameters of the heart. J Pharmacol Exp Ther. 1975;193(1):182-93.
13. Bradley R Fruen, James R Mickelson and Charles F Louis. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. Am Soc Biochem and Mol Biol. 1997;272(43):26965-71.
14. Burt JM, Massey KD, Minnich BN. Uncoupling of cardiac cells by fatty acids: structure-activity relationships. Am J Physiol. 1991;260:439-48.
15. Cast Investigators (Cardiac Arrhythmia Suppression Trials Investigators). Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. N Engl J Med. 1989;321:406-12.
16. Carroll Joan F, Jones A E, Hester R L, Reinhart G, Cockrell K, Mizelle HL. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. Am Heart J. 1997;30:1376-81.
17. Christian Resource Center. Gerard J. s. Internet-Literaturverzeichnis.
18. DAB-Kommentar. Kommentar zum DAB 1999. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2000. 13. Lfg.; H16; S. 1-2.
19. DAB. Amtliche Ausgabe; Monographie Herzgespannkraut. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, Govi-Verlag und Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn; 2001.
20. Denborough M. Malignant Hyperthermia. Lancet. 1998;352(9134):1131-6.
21. Deschauer T. Illustrated Phytotherapy. s. Internet-Literaturverzeichnis.
22. Dhein S, Müller A, Klaus W. Prearrhythmia: Changes preceding arrhythmia, new aspects by epicardial mapping. Basic Res Cardiol. 1990;85:285-96.

23. Dhein S; Das proarrhythmische Risiko von Antiarrhythmika - Eine in vitro Studie (Habilschr. med.). Köln: Univ. Köln; 1992.
24. Dhein S, Müller A, Gerwin R, Klaus W. Comparative study on the proarrhythmic effects of some class I antiarrhythmic agents. *Circulation*. 1993;87:617-31.
25. Dhein S. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19(6):229-41.
26. Dhein S, Krüsemann K, Schaefer T. Effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid on the activation and repolarisation wavefronts in isolated rabbit hearts. *Br J Pharmacol*. 1999;128:1375-84.
27. Dhein S, Hammerath S-B. Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2001;364:397-408.
28. Dhein S, Hindricks G. Herzrhythmusstörungen. In: Brune K u. Lemmer B, Herausgeber. *Pharmakotherapie; Klinische Pharmakologie*. München und Jena: Urban Fischer Verlag; 2004. S. 277-99.
29. Dhein S. Pharmacology of gap junctions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2004;62:287-98.
30. Dhein S, Jongsma HJ. Forming the network-gap junctions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2004;62(2):225-27.
31. Dhein S. The Langendorff heart. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, Herausgeber. *Practical Methods in Cardiovascular Research*; Berlin: Springer-Verlag; 2005 a. S. 155-72.
32. Dhein S, Michealis B, Mohr FW, 2005 b. Antiarrhythmic and electrophysiological effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2005 b;371(3):202-11.

33. DiMarco JP, Gersh BJ, Opie LH. Antiarrhythmic drugs and strategies. In: Opie LH, Gersh BJ, Herausgeber. Drugs for the Heart. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2005. S. 218-74.
34. Doenecke VP. Myocardial excitability under the influence of digitalis glycosides and antiarrhythmia-agent. Fortschr Med. 1977;95(3):163-6.
35. Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. 1. Auflage. West-Deutschland: Biomesstechnik Verlag March GmbH; 1988.
36. Durrer D, van der Tweel LH. Spread of activation in the left ventricular wall of the dog. Activation conditions at the epicardial surface. Am Heart J. 1954;47:192-203.
37. Ellingwood F. Therapeutics and Pharmakognosie - American Eclectic Materia Medica; 1. Auflage. Portland: Eclectic medical Publications; 1919.
38. Erspamer V. Ricerche farmacologiche sul Leonurus cardiaca L (e sul Leonurus marrubiastrum L). Arch Int Pharmacodynam Thérap. 1948;76:132.
39. Ewringmann A. Leitsymptome beim Kaninchen (Diagnostischer Leitfaden und Therapie). 1. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2005.
40. Fangyi Zhao, Pin Li, Wayne Chen SR, Charles F Louis, and Bradley R Fruen. Dantrolene Inhibition of Ryanodine Receptor Ca^{2+} Release Channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. J Biol Chem. 2001;276(17):13810-16.
42. Felter HW. American Eclectic Materia Medica. s. Internet-Literaturverzeichnis.
43. Fox W. Family botanic guide. 23. Auflage. Sheffield: Medical Botanists; 1924.
44. Friedland J. Arzneiformlehre für pharmazeutisch-technische Assistenten. 2. Auflage. Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag; 1992.
45. Fuchs L. De historia stirpium commentarii. Tübingen. 1543:Kapitel CXLIX.

46. Garvey JL, Kranias EG, Solaro RJ; Phosphorylation of the C-protein, troponin I and phospholamban in isolated rabbit hearts. *Biochem J.* 1988;249(3):709-14.
47. Gottwald W; In: Gruber U, Klein W, Herausgeber. *RP-HPLC für Anwender.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH;1992. S.2-3.
48. Hafner D. Antiarrhythmika. s. Internet-Literaturverzeichnis.
49. Hahn AB, Barkin R, Oestreich SJK. Glycosides. In: Manning TA, Herausgeber. *Cardiac drugs- Pharmacology in nursing.* St. Louis, MO: Mosby Company; 1982. S. 568-604.
50. Hahn-Deinstrop E. *Dünnschicht-Chromatographie.* 1. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 1998.
51. Hartwich C. *Die neuen Arzneidrogen aus dem Pflanzenreiche.* 1. Auflage. Berlin: Julius-Springer-Verlag; 1897.
52. Hegnauer R. *Chemotaxonomie der Pflanzen.* Band 4; 1. Auflage. Basel und Stuttgart: Birkenhäuser-Verlag; 1966.
53. Henkel A. *American medicinal leaves and herbs:* U.S. Department of Agriculture; Bureau of Plant Industry-Bulletin. Washington Government printing office 1911;219:26.
54. Hess W. *Herz und Kreislauf - Angewandte Physiologie und Pathophysiologie.* 1. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2004.
55. Hiegemann H. *Vergleich zweier Zuführungssysteme zur Elektrobetäubung von Schlachtschweinen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Fleischbeschaffenheit.* (Dissertation med.-vet.) Hannover: Univ. Hannover; 2002.
56. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952;117:500-44.
57. Hoffmann HF. *Gründ- und ausführliches Verzeichnis Aller Arzeneien.* s. Internet-Literaturverzeichnis.

58. Honerjäger P. Cardioactive substances that prolong the open state of sodium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1982;92:1-74.
59. Honerjäger P, Frelin C, Lazdunski M. Actions, interactions and apparent affinities of various ceveratrum alkaloids at sodium channels of cultered neuroblastoma and cardiac cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1982;321:123-29.
60. Honerjäger P, Meissner A. The positive inotropic effect of aconitine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1983;322:49-58.
61. Jung W, Lüderitz B. Kommentar Emiat- und Camiat-Studie. s. Internet-Literaturverzeichnis.
62. Kattinger P, Ewringmann A, Weyland J, Skrodzki M. Kardiologische Untersuchungen beim Kaninchen. *Kleintierpraxis.* 1999;44:715-804.
63. Katz AM. *Physiology of the heart.* 3. Ausgabe. Philadelphia USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
64. Kersten U, Morisse B. Herzkrankheiten. In: Niemand HG, Suter PF, Herausgeber. *Praktikum der Hundeklinik.* Berlin: Parey Buchverlag; 2001. S. 586-87.
65. Kittleson MD. Feline myocardial disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Herausgeber. *Veterinary internal medicine.* 6. Auflage St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. S. 1082-103.
66. Kleber AG, Janse MJ, van Capelle FJL, Durrer D. Mechanism and time course of ST und TQ segment changes during acute regional myocardial ischemia in the pig heart determined by extracellular und intracellular recordings. *Circ Res.* 1978;42:603-13.
67. Kornberg M. Neurologische Erkrankungen. In: Niemand HG, Suter PF, Herausgeber. *Praktikum der Hundeklinik.* Berlin: Parey Buchverlag; 2001. S.1075-83.
68. Kozlova LM. *Aptečnoe Delo.* 1964;13(5):33.

69. Kuschinsky G, Reuter H. Über den Wirkmechanismus von Ajmalin. Naunyn Schmiedeberg's Arch exp Path Pharmac. 1961;242:17-23.
70. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Pflüger's Arch ges Physiol. 1985;61:291-31.
71. Lee Y-S, Rose HH, Ogisho Y, Goto N, Takahashi R, Fujiwara K. Mycardiopathy in rabbits experimental infected with Tyzzer's organism. Japan J Exp Med. 1976;46:371-82.
72. Lesh MD, Pring M, Spear JF. Cellular uncoupling can unmask dispersion of action potential duration in ventricular myocardium. Circ Res. 1989;65:1426-1440.
73. List PH, Schmidt PC. Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen. Stuttgart: Wissen-schaftliche Verlagsgesellschaft; 1984 a. S.31-41.
74. List PH, Schmidt PC. Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen. Stuttgart: Wissen-schaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1984 b. S. 120-26.
75. List PH, Schmidt PC. Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen. Stuttgart: Wissen-schaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1984 c. S. 87.
76. Lohse MJ, Engelhardt S. Proteinkinase A transgenes: The many faces of cAMP. Circ Res. 2001;89:938-40.
77. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen TH. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? Circ Res. 2003;93:896-906.
78. Lonicerus A. Kreuterbuch. Frankfurt: Druchts und Verlegts Matthäus Wagner; Neuauflage 1679;Kap. 230.
79. Madaus G. Lehrbuch der biologischen Heilmittel Band 2. Leipzig: Georg-Thieme-Verlag; 1938. S. 1738-42.
80. Madaus G. Lehrbuch der biologischen Heilmittel Band 3. Ravensburg: Mediamed Verlag; 198. S. 388-400.

81. Matthiolus PA. New-Kreuterbuch. Leonurus cardiaca. 1565. S. 397.
82. Mathes P, Gehring J, Bungeroth K, Zuber A, Rüdell R. Rhythmusstörungen des Herzens. 4. Auflage. München: Pharmazeutische Verlagsgesellschaft mbH; 1985.
83. Matsuda K, Hoshi T, Kameyama S. Effects of Aconitine on the cardiac membrane potential of the dog. Jpn J Physiol. 1959;9:419-29.
84. Meyer's grosses Taschenlexikon. 2. Auflage Mannheim/Wien/Zürich: Digiell W. Kwiatowski G;1987. Kräuterbuch; S. 197.
85. Milkowska-Leyck K, Filipek B, Strzelecka H. Pharmacological effects of Lavandulifoliosid from Leonurus cardiaca. J Ethnopharmacol. 2002;80:85-90.
86. Monnier N, Romero NB, Ceraie J, Nivoche Y, Qi D, MacLennan DH, et al. An autosomal dominant congenital myopathy with cores and rods is associated with a neomutation in the RYR 1 gene encoding the skeletal muscle ryanodine receptor. Hum Mol Genet. 2000;9(18):2599-608.
87. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1996.
88. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1996 a.
89. Nahrstedt A. Drogen und Phytopharmaka mit sedierender Wirkung. Zeitschrift für Phytotherapie 1985;6:101-9.
90. Naylor WAH. Examination of Leonurus cardiaca. Pharmaceutical J Transactions 1894;25:183.
91. Nilius B, Boldt W, Benndorf K. Properties of aconitine-modified sodium channels in single cells of mouse ventricular myocardium. Gen Physiol Biophys. 1986;5:473-84.

92. Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. J Physiol. 1984;353:1-50.
93. Nusser B. Wer verfasste den Hortus sanitatis? Naturheilpraxis. 2004;11:1-3.
94. Nygren A, Giles WR. Mathematical stimulation of slowing of cardiac conduction velocity by elevated extracellular K^+ in a human atrial strand. Annals Biomed Eng. 2000;28:951-57.
95. Orlandi E. Sull'applicazione del leonurus cardiaca nella terapia infantile. Lattante. 1950;21(9):582-86.
96. Pahlow M. Das grosse Buch der Heilpflanzen. Überarbeitete Neuauflage. München: Gräfe und Unzer Verlag GmbH; 1993.
97. Panciera DL. Cardiovascular complications of Thyroid Disease. In: Kirk RW, Herausgeber. Kirks'current veterinary therapy. 13. Auflage Philadelphia USA: W.B. Saunders Company; 2000. S. 716-19.
98. Pater B. Neure Beobachtungen über den Heilwert von Leonurus cardiaca. Pharm Monatsh. 1933;14:1-8.
99. Paterson DJ. Role of potassium in the regulation of systemic physiological function during exercise. Acta Physiol Scand. 1996;156:287-94.
100. Peper K, Trautwein W. The effect of aconitine on the membrane current in cardiac muscle. Pflügers Archiev. 1967;296:328-36.
101. Peyer W, Vollmar H. Über Leonurus cardiaca. Pharm Zentralhalle. 1935;7:97.
102. Polacci LG. Pharmacology of Leonurus cardiaca and Leonurus marrubiastrum. Farm Sci tec. 1948;3:678.
103. Potlog AS. Two new medicinal plants: Leonurus cardiaca L var. villosus and Eryngium planum. Heil und Gewürzpflanzen. 1936;17:24.

104. Pschyrembel klinisches Wörterbuch. 258. Auflage Berlin: De Gruyter-Verlag; 1998
a. Herzrhythmusstörungen; S. 662-63.
105. Pschyrembel klinisches Wörterbuch. 258. Auflage Berlin: De Gruyter-Verlag; 1998
b. EEG; S. 407-8.
106. Pschyrembel klinisches Wörterbuch. 258. Auflage Berlin: De Gruyter-Verlag; 1998
c. Baldrianwurzel; S. 166.
107. Reuter G, Diehl HJ. Arzneipflanzen der Gattung Leonurus und ihre Wirkstoffe. Pharmazeutisches Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 1969:S. 586-89.
108. Roden DM, Balser JR, George JR AL, Anderson ME. Cardiac ion channels. Annu Rev Physiol. 2002;64:431-75.
109. Rogers M. Herbalpedia. Herb Growing Marketing Network. 2000:1;780-89.
110. Romanowski H. On the effect and application and chemical structure of leonurus cardiaca L, a polish medicinal plant unjustifiably neglected. Pol Tyg Lek. 1959;14;1146-50.
111. Saucermann JJ, Bruntons LL, Michailova P, McCulloch AD. Modeling β -adrenergic control of cardiac myocyte contractility in Silicio. J biol Chem. 2003;278(28 Pt 48):47997-48003.
112. Sauerhoff F. Ethymologisches Wörterbuch der Pflanzennamen. 2. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2003.
113. Sayre L. Sayre's Materia Medica part V. s. Internet-Literaturverzeichnis.
114. Sawanobori T, Adaniya H, Hirano Y, Hiraoka M. Effects of antiarrhythmic agents and Mg^{2+} on aconitine-induced arrhythmias. Jpn Heart J. 1996;37(5):709-18.
115. Schipperheyn JJ. The pathophysiology of potassium and magnesium disturbances. A cardiac perspective. Drugs 1984;28 Suppl 1:S112-9.

116. Scholz H. Antiarrhythmische und kardiodepressive Wirkungen antiarrhythmischer Substanzen. Z Kardiologie. 1988;77 Suppl 5:S113-19.
117. Schulz OE, Haack HJ. Isolierung und Versuche zur Konstitutionsaufklärung von drei Bitterglykosiden aus *Leonurus cardiaca*. Arzneimittel Forschung 1961;11:957-78.
118. Schwedt G. Taschenatlas der Analytik. 3. Auflage. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag; 1996.
119. Sejersted OM, Sjøgaard G. Dynamics and consequences of Potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. Physiol Rev. 2000;80(Pt 4):1-11.
120. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle: The M-cell. Circ Res. 1991;68:1729-41.
121. Smeets JLRM, Allesie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J. The wavelength of the cardiac impulse and reentrant arrhythmias in isolated rabbit atrium. Circ Res. 1986;58:96-108.
122. Smith HH. Ethnobotany of the Menomini Indians. Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee Wisconsin, USA. 1923;4(1):34-35.
123. Sorensen V, Nielsen-Kudsk F. Myocardial pharmacodynamics of dopamine, dobutamine, amrinone und isoprenaline compared in the isolated rabbit heart. Eur J Pharmacol. 1986;124(Pt 1):51-70.
124. Spach und Dolber. Relating extracellular potentials and their derivatives to anisotropic propagation in dog atria. A mechanism for both preventing and initiating reentry. Circ Res. 1986;58:356-71.
125. Suter PF. Erkrankungen des Verdauungsapparats In: Niemand HG, Suter PF, Herausgeber. Praktikum der Hundeklinik. Berlin: Parey Buchverlag; 2001. S. 743-46.
126. Swerew S. Sowjetskaja Farmazia 1931;15:1-6.

127. Szentkuti L. Muskelphysiologie. In: von Engelhardt W, Breves G, Herausgeber. Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke-Verlag; 1999. S. 110-26.
128. Tilley LP. EKG bei Hund und Katze. 2. Auflage. Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt; 1989.
129. Ungemach FR. Antiarrhythmika. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R, Herausgeber. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Berlin: Parey-Buchverlag; 2006. S. 142-49.
130. Vassalle M. The relationship among cardiac pacemakers: overdrive suppression. Circ Res. 1977;41:269-77.
131. Verter W, Dietz O. Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems. In: Dietz O, Huskamp B, Herausgeber. Handbuch der Pferdepraxis. Stuttgart: Enke Verlag; 1999. S. 273-95.
132. Vester EG, Strauer BE. Was ist gesichert in der Therapie tachykarder Herzrhythmusstörungen. Der Internist. 1997;38:1219-94.
133. Vetidata 2005. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für die Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht (VETIDATA). s. Internet-Literaturverzeichnis.
134. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis. Berlin: Springer-Verlag; 1983.
135. Waldmann K-H, Wendt M. Lehrbuch der Schweinekrankheiten. 2. Auflage. Berlin: Parey-Verlag; 2001.
136. Watano T, Harada Y, Harada K, Nishimura N. Effect of Na⁺/Ca⁺ exchange inhibitor, KB-R7943 on ouabain-induced arrhythmias in guinea-pigs. Br J Pharmacol. 1999;127:1846-50.
137. Weber H, Tegelkamp M. Praktikum Instrumentelle Analytik. s. Internet-Literaturverzeichnis

- 138. Wenzel J. Problems and perspectives of central nervous system regeneration. *Verh Anat Ges.* 1977;71(Pt 1):425-31.
- 139. Weidmann S. The effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *J Physiol.* 1951;115:227-36.
- 140. Weina C, London R, Murphy E, Steenbergen CH. Regulation of the Ca^{2+} gradient across the sarcoplasmic reticulum in perfused rabbit hearts. *Circ Res.* 1998;83:898-907.
- 141. Weinmann JW. *Phytanthoza iconographia.* Regensburg 1737;Bd.2:S.47.
- 142. Weirich J, Wenzel W. Aktuelle Einteilung antiarrhythmisch wirksamer Substanzen. *Z Kardiol.* 2000;89 Suppl 3:S62-67.
- 143. Weiss RF. *Herbal medicine.* 3. Auflage Stuttgart: Thieme-Verlag; 2001.
- 144. Wichtl M. *Teedrogen und Phytopharmaka.* 4. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2002.
- 145. Wieser HG, Jallon P. Epilepsie. In: Hess K, Steck A, Herausgeber; *Kompedium der Neurologie.* Bern: Hans-Huber-Verlag; 2002. S.183-224.
- 146. Wilder A. National Eclectic Medical Association for the Years 1882-83;X:79.
- 147. Winslow E. Evaluation of antagonism of aconitine-induced Dysrhythmias in mice as a method of detecting and assessing antidysrhythmic activity. *Br J Pharmac.* 1980;71:615-22.
- 148. Wit AL, Dillon SM. Anisotropic reentry. In: Shenasa M, Borggreffe M, Breithardt G, Herausgeber. *Cardiac Mapping.* Mount Kisco, NY:Futura publishing CO;1993. S.127-52.
- 149. Wit AL. Cellular electrophysiologic mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cardiology Clinics.* 1990; 8(Pt 3):393-409.

150. Waldo AL, Wit AL. Mechanisms of cardiac arrhythmias. Lancet. 1993;341:1189-93.

8.1 INTERNET- LITERATURVERZEICHNIS

1. Anon. Therapie von Arrhythmien. 2004 (zitiert vom 06.10.2004):1-16, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie, Medizinische Universität Graz.
2. <<http://www.meduni-graz.at/pharma/VO041216.pdf>>
3. Anon. Physiologie und Pathophysiologie des Kalium-Haushaltes. 2005 a (zitiert vom 11.12.2005):8-9.
<http://www.univie.ac.at/graf/B14/Kalium/K_Vorlesung.pdf>
4. Anon. Leonurus cardiaca-Motherwort. 2005 b (zitiert vom 13.06.2005):1-2.
< <http://botanical.com/botanical/mgmh/m/mother55.html>>
5. Anon. Leonurus cardiaca. 2005 c (zitiert vom 03.03.2005):1-2.
<<http://www.homoeopathiker.de/Galerie//leonurusc1.htm>>
6. Christian Resource Center. Gerard J. 2001 (zitiert vom 12.12.2001):1-3.
<<http://www.nisbett.com/herbs/m/mother55.html>>
7. Deschauer T. Illustrated Phytotherapy. Maywood 1945:Book 2;S. 40. Nr. 196.
<<http://www.swsbm.com/Ephemera/Deschauer-2.pdf>>
8. Felter HW. American Eclectic Materia Medica, Therapeutics and Pharmacognosie 1922 (zitiert vom 19.07.2005):1.
<<http://www.henriettesherbal.com/eclectic/felter/leonurus.html>>
9. Hafner D. Antiarrhythmika. 2005 (zitiert vom 07.05.2005):1-17.
<http://www.uniklinik-duesseldorf.de/img/ejbfile/Antiarrythmika_VL_MED_IIpdf?id=4353>
10. Hoffmann HF. Gründ- und ausführliches Verzeichnis Aller Arzeneyen / so wohl Einfachen als Zusammengesetzten / in der hochfürstlichen Zellischen Apotheken zu finden. 1691 (zitiert vom 22.05.2007) CAP XII:1-2.

- <http://www.digibib.tu-bs.de/view_page.php?max_page=490&minpage=1&url=http%3A%2F%2Fbib1lp1.rz.tubs.de%2Fdocportal%2Fservlets%2FMCRFileNodeServlet%2FDocPortal_derivate_00000978&suffix=gif&derivate_id=978&page=365>
11. Jung W, Lüderitz B. Kommentar Emiat- und Camiat-Studie. Medizinische Universitäts-klinik und Poliklinik Bonn. 2005 (zitiert vom 12.07.2005):1-3. ISSN 0947 – 8736.
<<http://www.klinikundforschung.de/sup/heft5/luederitz.htm>>
12. Sayre L. Sayre's Materia Medica part V. 1917 (zitiert vom 31.05.2005):S.14.
<<http://www.swsbm.com/SayreMM/SayreMM.html>>
13. Vetidata 2005. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für die Arzneimittel-anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht (VETIDATA); 2005 (zitiert vom 12.Mai 2005);Carazolol:S. 1
<<http://www.vetidata.de>>
14. Weber H, Tegelkamp M. Praktikum Instrumentelle Analytik FB01 Chemie: Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 2004 (zitiert vom 12.08.2004):1-11.
<http://www.fh-niederrhein.de/fb01/Hauptstudium/Instrumentelle_Analytik/praktika/praktikum_spezielle_ia/HPLCIA.PDF>

9 ANHÄNGE

9.1 ANHANG 1

Tab. 1: Auflistung der Kräuterbücher und anderer Schriften, in denen *Leonurus cardiaca* schriftlich dokumentiert wurde.

Autor	Zeit	Kräuterbuch/Veröffentlichung	Besonderheiten	Literaturquelle
Dioskurides	1. Jh. n. Cr.	Materia medica	Einsatz bei Magenbeschwerden	REUTER U. DHIEL 1961
unbekannt	1485	Hortus Sanitatis / gart der gesuntheit	Erstes deutsches Kräuterbuch; <i>Leonurus cardiaca</i> bei Magendrücken, Herzkrämpfen und Engbrüstigkeit	NUSSER 2004
Paracelsus (Theophrastus Bombastus von Hohenheim)	1536	Die grosse Wundtartzney	Glänzender Diagnostiker; <i>Leonurus cardiaca</i> bei Herzzittern	ANON. 2005 c
Dorstenius	1540	Botanicon	Direkte Beschreibung einer Wirkung beim Herzrasen; Anwendung einer dreisprachigen Nomenklatur	ROMANOWSKI 1959
Leonard Fuchs	1543	"De historia stirpium commentarii" / New Kreuterbuch	Arzt und Professor in Tübingen; <i>Leonurus cardiaca</i> bei Magendrücken, Herzkrämpfen, Engbrüstigkeit und Fallsucht	FUCHS 1543
Adam Lonicer	1564	Kreuterbuch	Naturforscher, Arzt und Botaniker. Einsatz von <i>Leonurus cardiaca</i> wie bei Fuchs	LONICER- US 1679
Pier Andrea	1565	Dioskurides-Kommentar	Arzt von der Leibarzt von	MATTHIO

Matthiolus			Erzherzog Ferdinand von Tirol und von Kaiser Maximilian II. Einsatz von Leonurus cardiaca wie bei Fuchs	LUS 1565
John Gerard	1597	The Herbal	In Latein verfasst	CHRISTIAN RESOURCE CENTER 2001
Nicolas Culpepper	1652	The English Physician Enlarged	In Englisch verfasst; Arzt, Botaniker und Astrologe; Leonurus cardiaca zur Vertreibung von Herzmelancholie	ANON. 2005 c
Hieronimus F. Hoffmann	1691	Gründ- und ausführliches Verzeichnüß Aller Arzeneyen	1.Apothekenverzeichnis mit Preisauflistung	HOFFMANN 1691
unbekannt	1721	Paris Pharmacopoea	Einsatz wie bei Culpepper (s. 2.2.1.2)	ROMANOWSKY 1959
Weinmann	1737	Phytanthoza iconographia	Einsatz wie bei Culpepper (s. 2.2.1.2)	WEINMANN 1737
Alexander Wilder	1882-83	National Eclectic Medical Association	nervöse, antispasmodische und uterus-tonisierende Wirkung	WILDER 1883
W.A.H. Naylor	1894	The pharmaceutical journal and transactions	Erste chemische Analyse des Herzgespannkrauts	NAYLOR 1894
E.M. Holms	1894	The pharmaceutical journal and transactions	Erste wissenschaftliche Beschreibung des Herzgespannkraut	NAYLOR 1894
Carl Hartwich	1897	Die neuen Arzneidrogen aus dem Pflanzenreiche	Bezeichnet Leonurus cardiaca in Deutschland als obsolet	HARTWICH 1897

Anhang 1

Alice Henkel	1911	American medicinal leaves and herbs	Rein pflanzliche Kurzbeschreibung	HENKEL 1911
Lucius Sayre	1917	Sayre's Materia Medica	Indikation als Tonikum und Expektorans	SAYRE 1917
Finley Ellingwood	1919	American Eclectic Materia Medica, Therapeutics and Pharmacognosie	Beschreibung u.a. der Herzwirksamkeit	ELLINGWOOD 1919
Harvey Wickes Felter	1922	The eclectic Materia Medica, Pharmacology and Therapeutics	Standardwerk für praktische Ärzte; Beschreibung als Emmenagogum und Antispasmodikum	WICKES FELTER 1922
Huron Smith	1923	Ethnobotany of the Menomini Indians	Leonurus cardiaca wird nicht verwendet	SMITH 1923
William Fox	1924	Family Botanic Guide	Botanisches Lehrbuch; Beschreibung als hilfreichste Pflanze bei Ausbleiben der Menstruation	FOX 1924
B. Pater	1930	Lehrbuch der biologischen Heilmittel	Empfehlung von Herzgespannkraut zusätzlich beim Kropf, Epilepsie und Prostatahyperplasie	MADAUS 1938
Thomas Deschauer	1945	Illustrated Phytotherapy	Illustrationen mit medizinischer Anwendung	DE-SCHAUER 1945

9.2 ANHANG 2

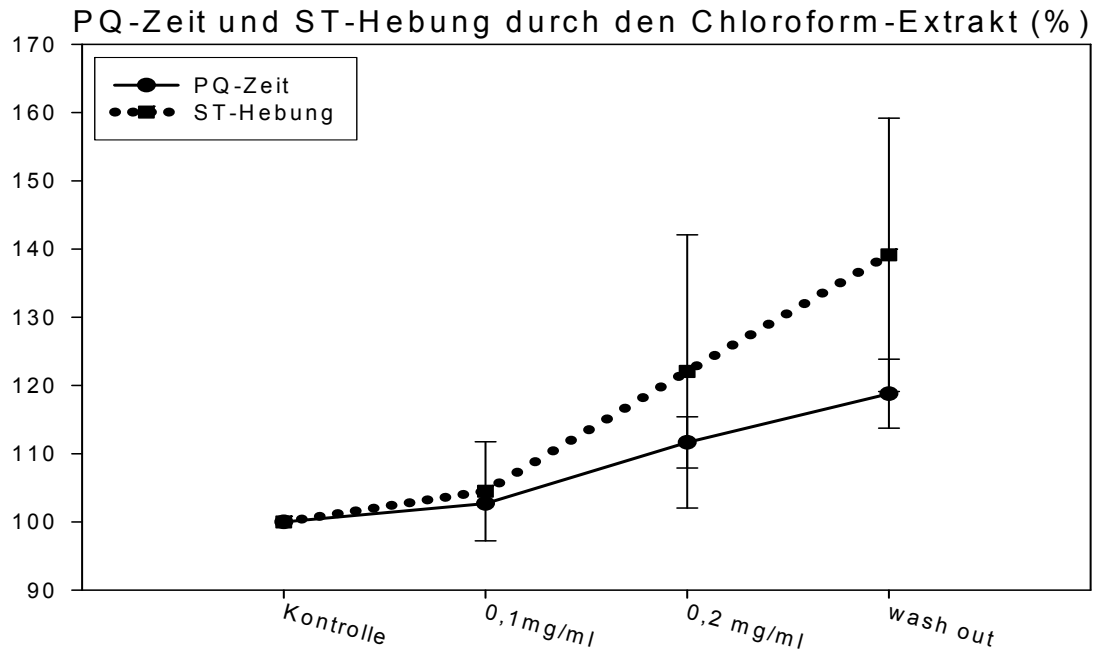


Abb. 1: Veränderung der PQ-Zeit und der ST-Hebung durch den Chloroform-Extrakt (n = 3) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

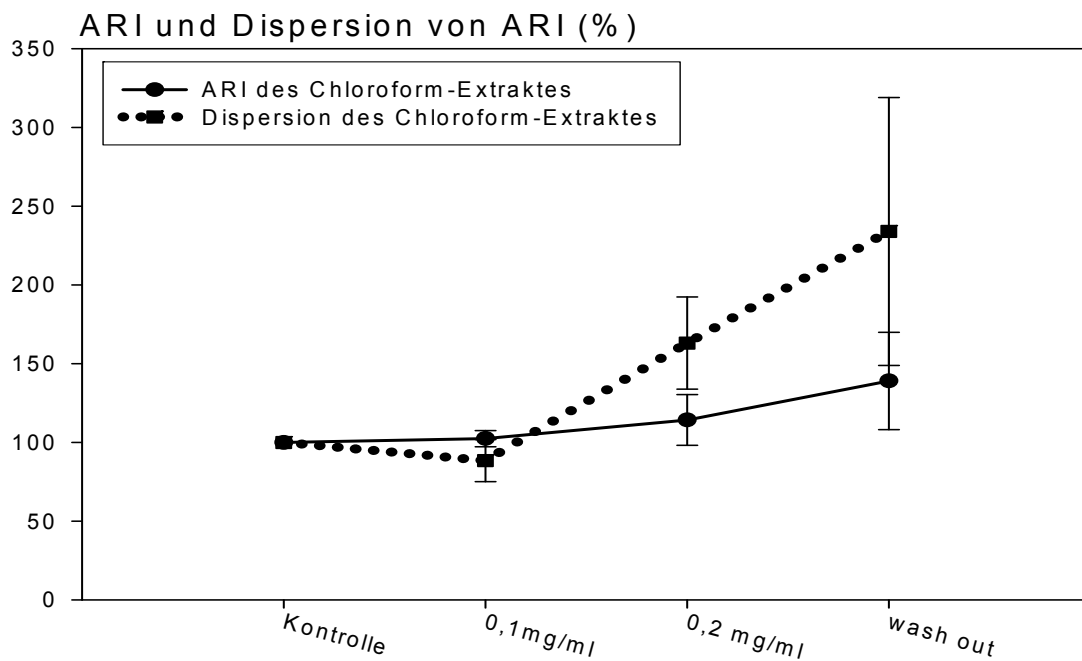


Abb. 2: Erhöhung der lokalen Potentialdauer (ARI) sowie der Dispersion von ARI durch den Einfluss des Chloroform-Extraktes (n = 3) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

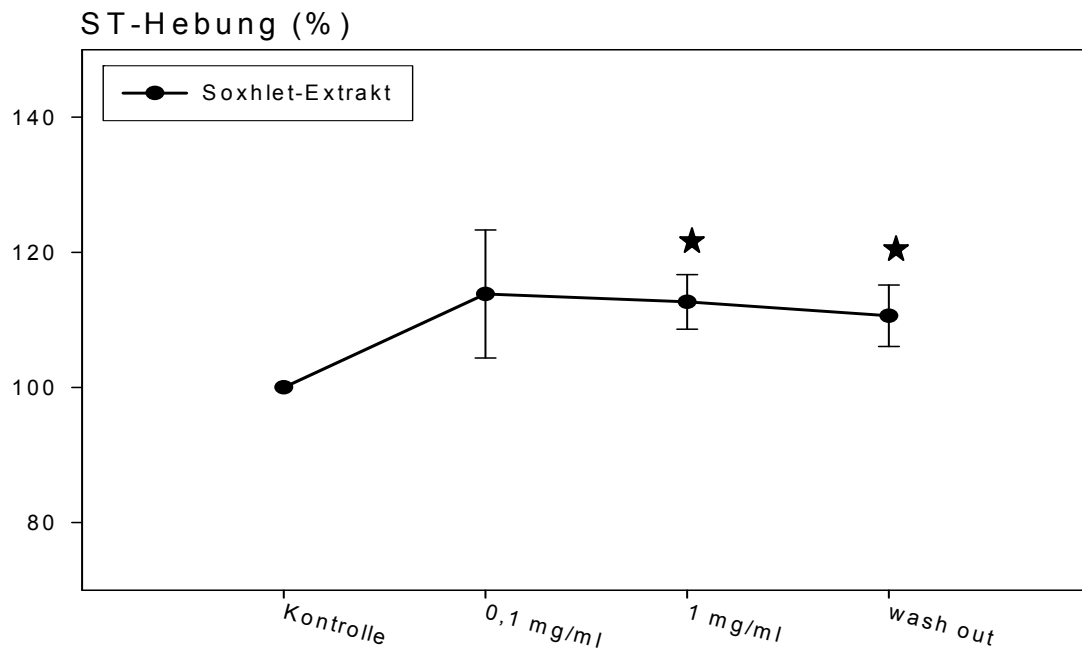
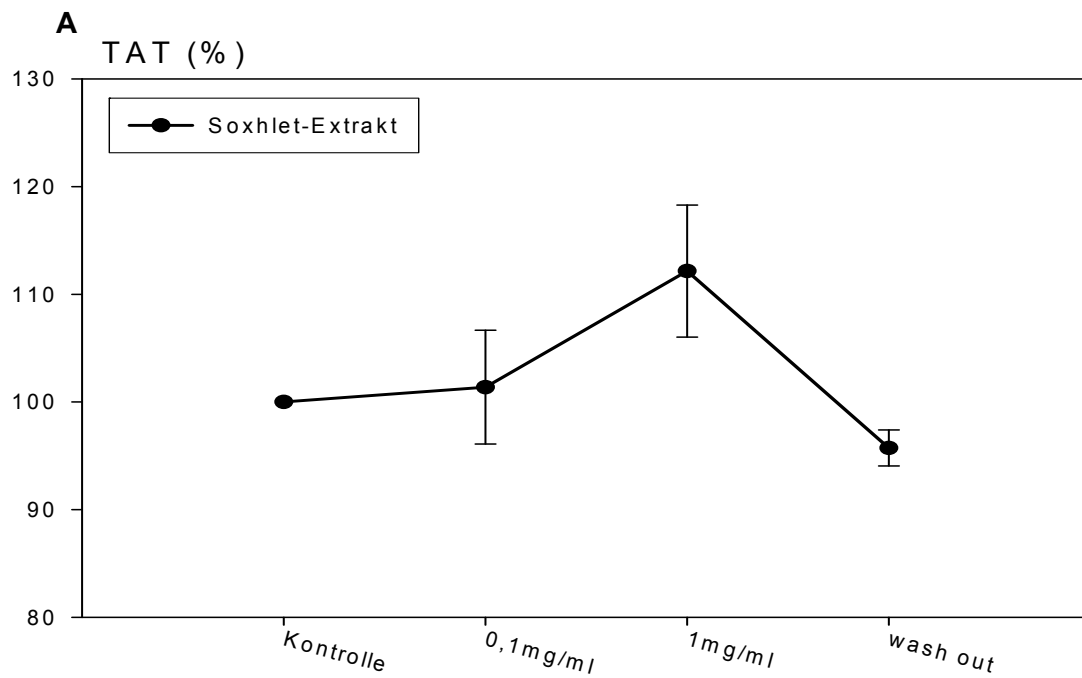


Abb. 3: Veränderung der ST-Hebung durch den Soxhlet-Extrakt (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.



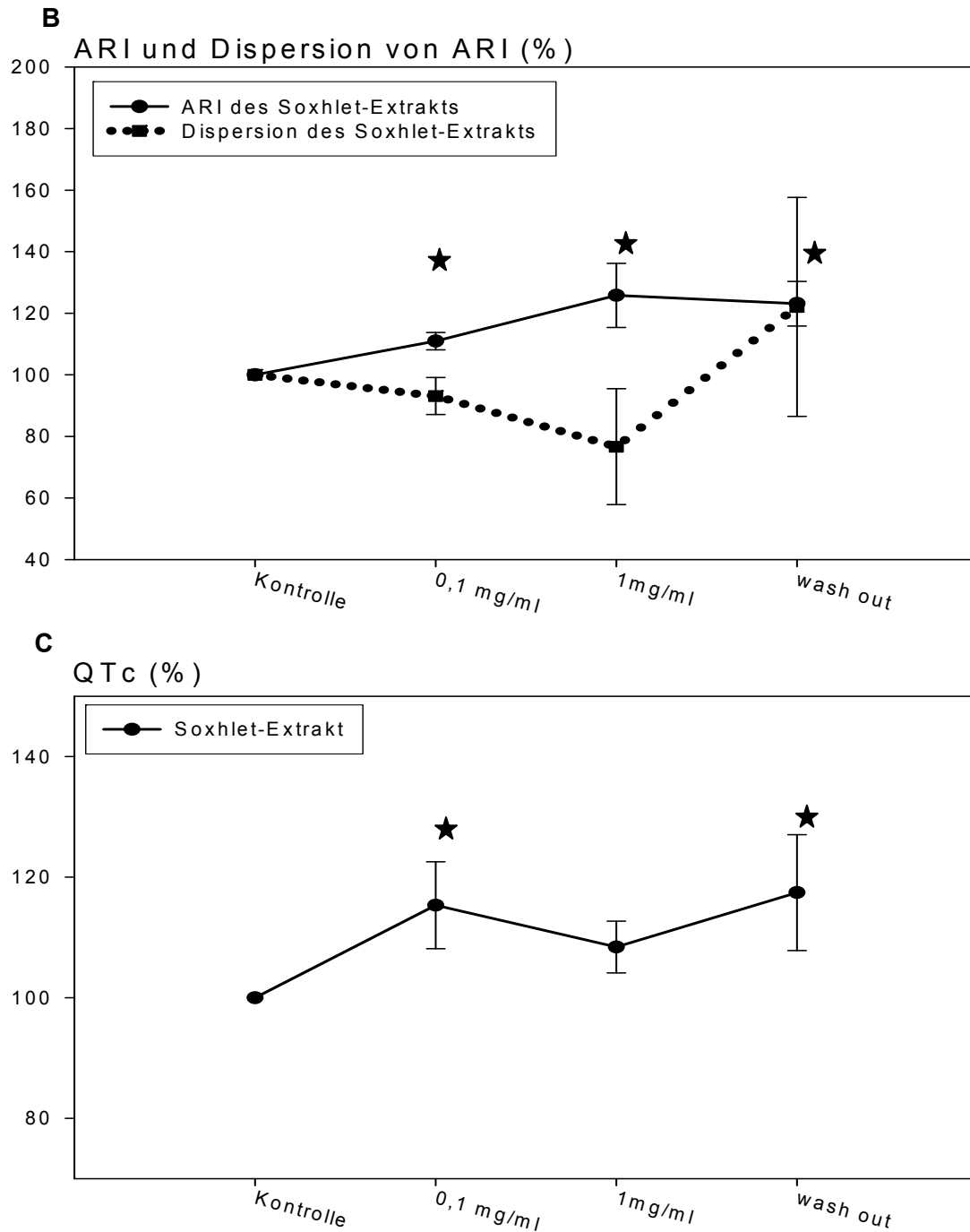


Abb. 4: Verlängerung der Gesamtaktivierungszeit (TAT) durch den Soxhlet-Extrakt (n = 6) (A); Verlängerung der lokalen Potentialdauer (ARI) und der Verminderung der Dispersion von ARI (ARI) unter dem Einfluss des Soxhlet-Extrakts (B) sowie der Erhöhung der frequenzkorrigierten Potentialdauer (QTc) (C) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollwerten sind durch einen ★ gekennzeichnet.

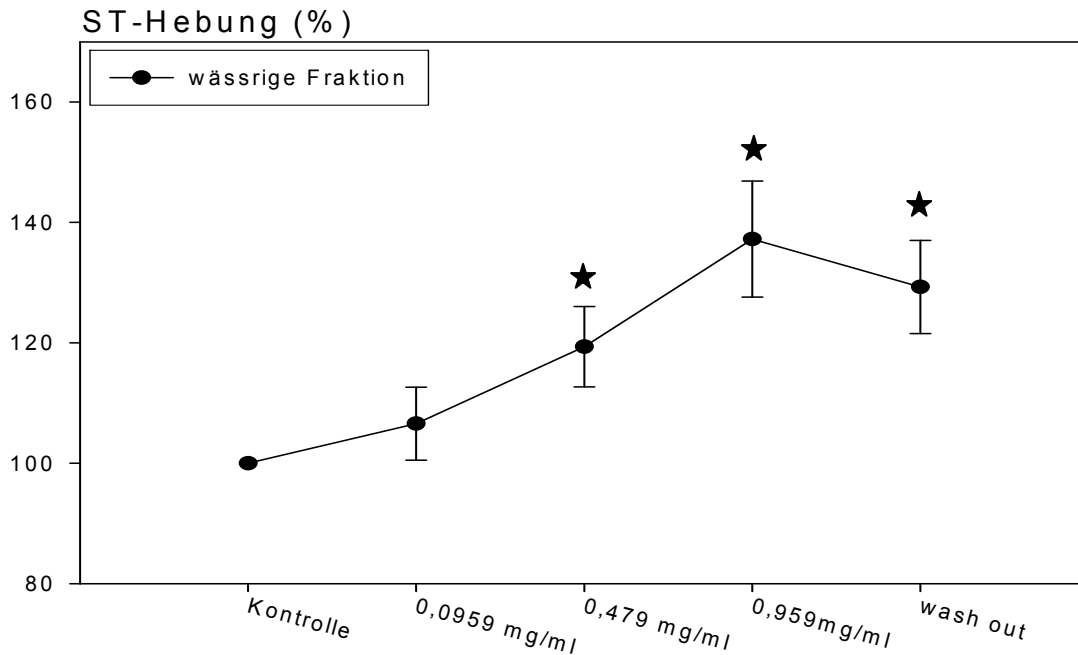


Abb. 5: Erhöhung der ST- Zeit durch die wässrige Fraktion (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

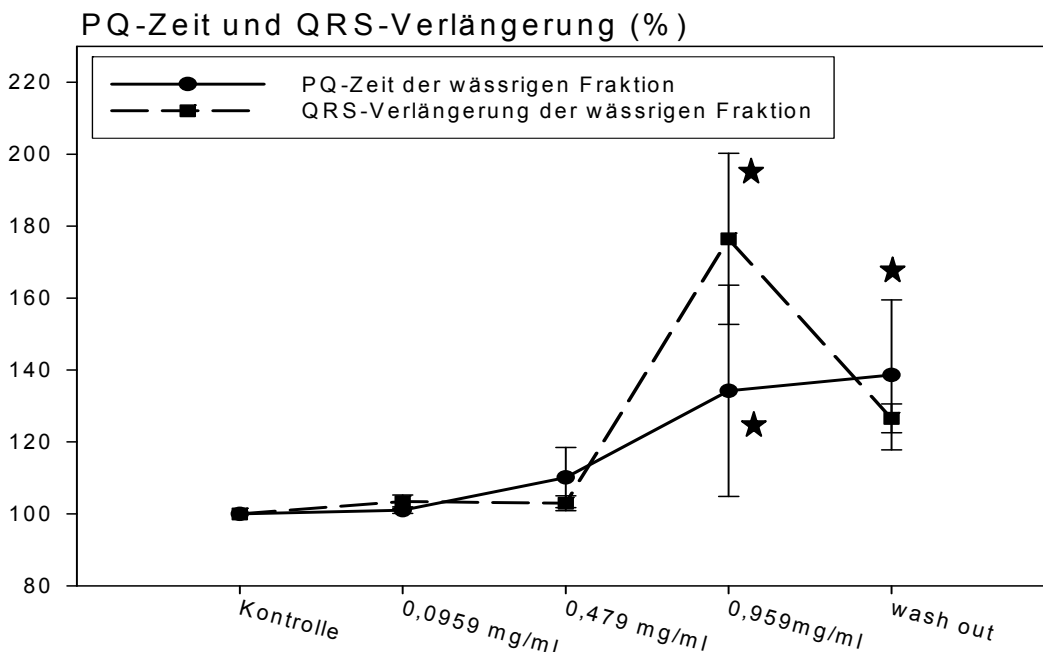


Abb. 6: Darstellung der Veränderung der PQ-Zeit und des QRS-Komplexes durch die wässrige Fraktion (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

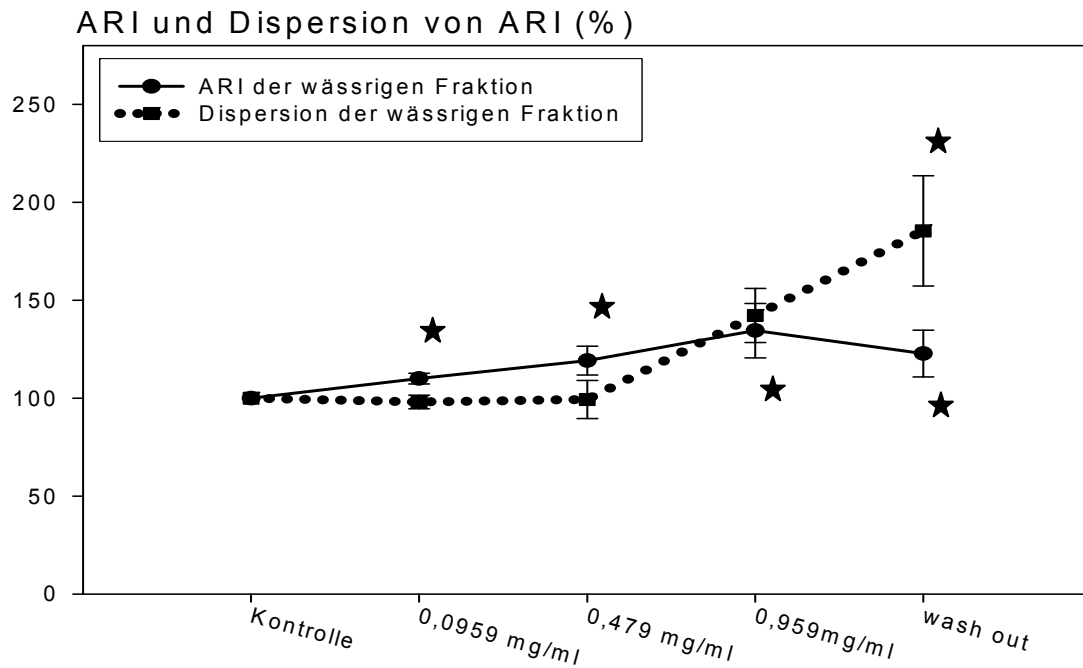


Abb. 7: Veränderung der lokalen Potentialdauer (ARI) und der Dispersion durch die wässrige Fraktion (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

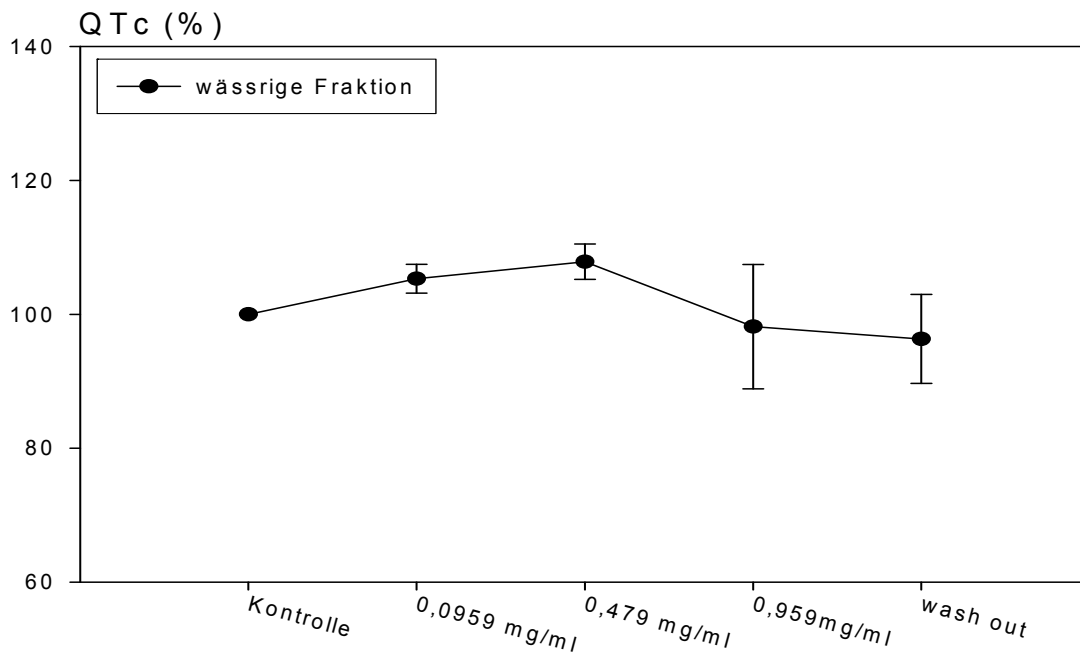


Abb. 8: Darstellung der QTc-Veränderung durch die wässrige Fraktion (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

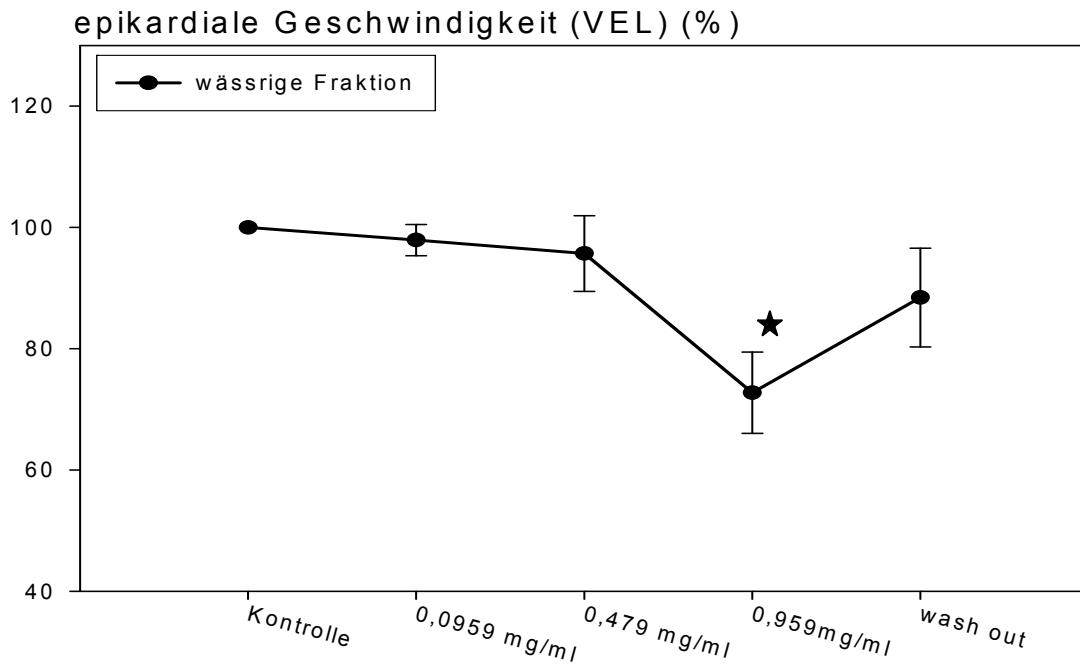


Abb. 9: Verlangsamung der epikardialen Geschwindigkeit (VEL) unter der wässrigen Fraktion (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

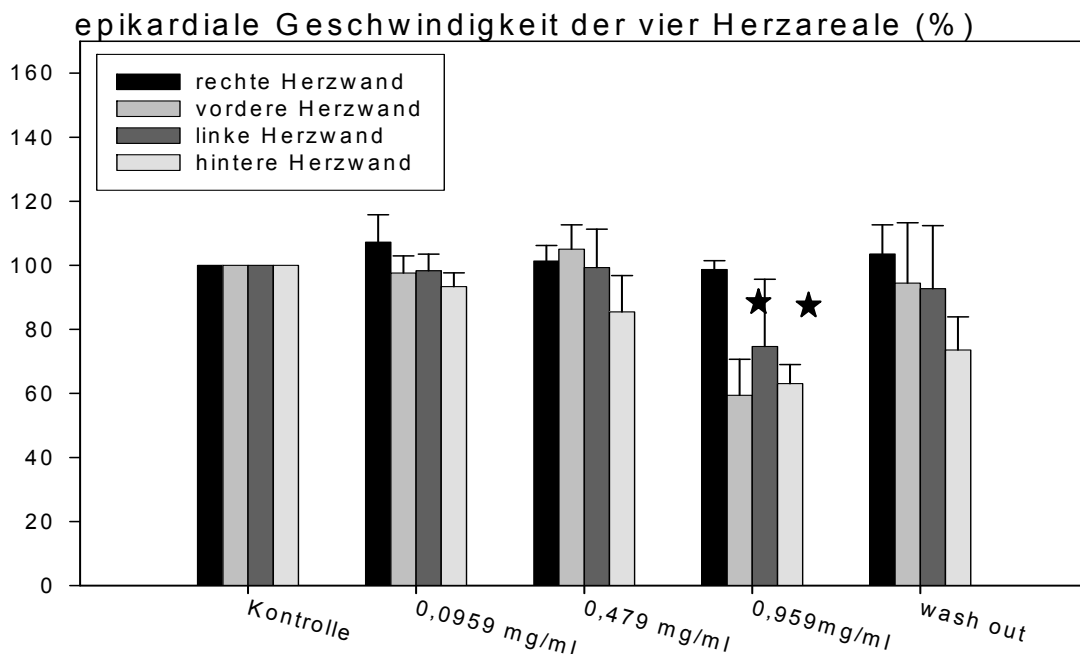


Abb. 10: Darstellung der epikardialen Geschwindigkeit aller vier Herzareale unter der Einwirkung der wässrigen Fraktion (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

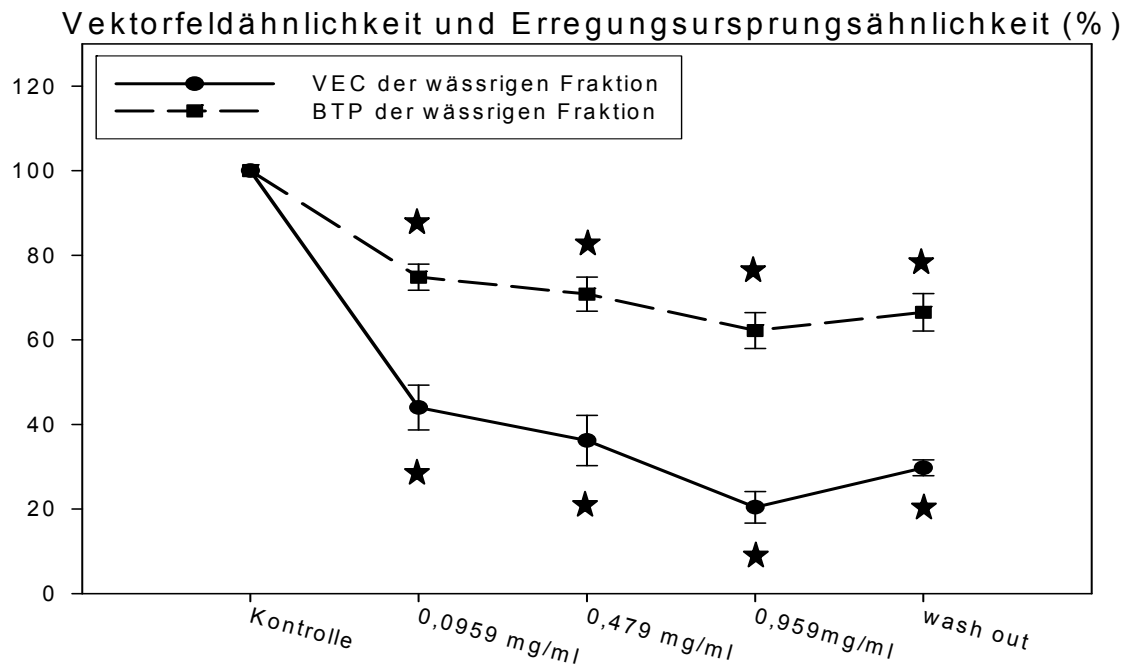


Abb. 11: Darstellung der Veränderungen der Vektorfeldähnlichkeit und der Erregungsursprungsähnlichkeit durch die wässrige Fraktion (n = 6) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

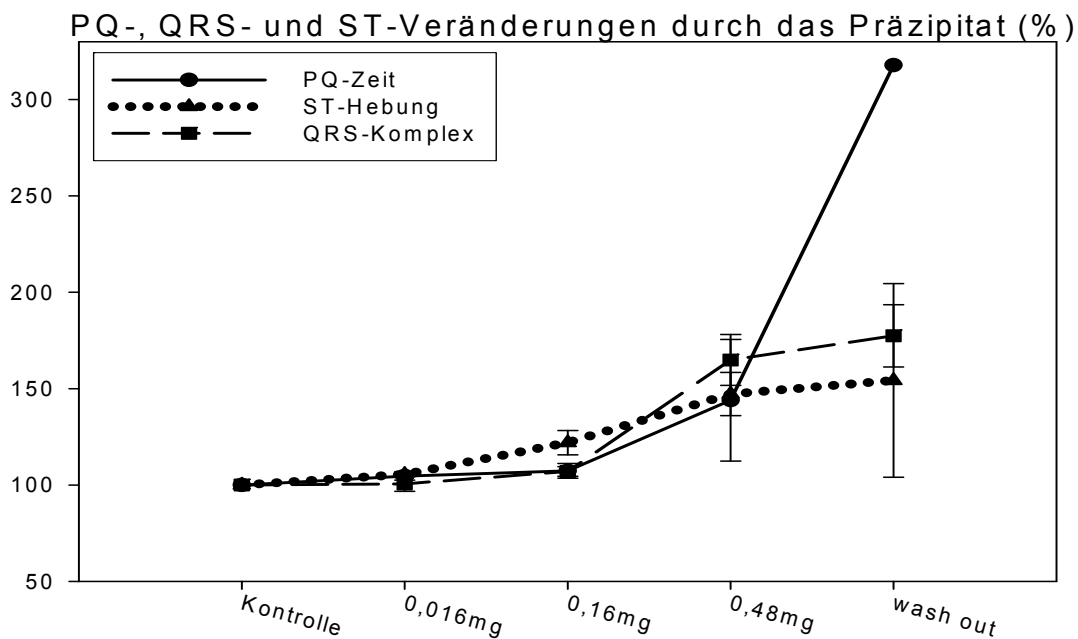


Abb. 12: Darstellung der Auswirkungen des Präzipitats (n = 3) auf die PQ-Zeit, die ST-Hebung und den QRS-Komplex im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

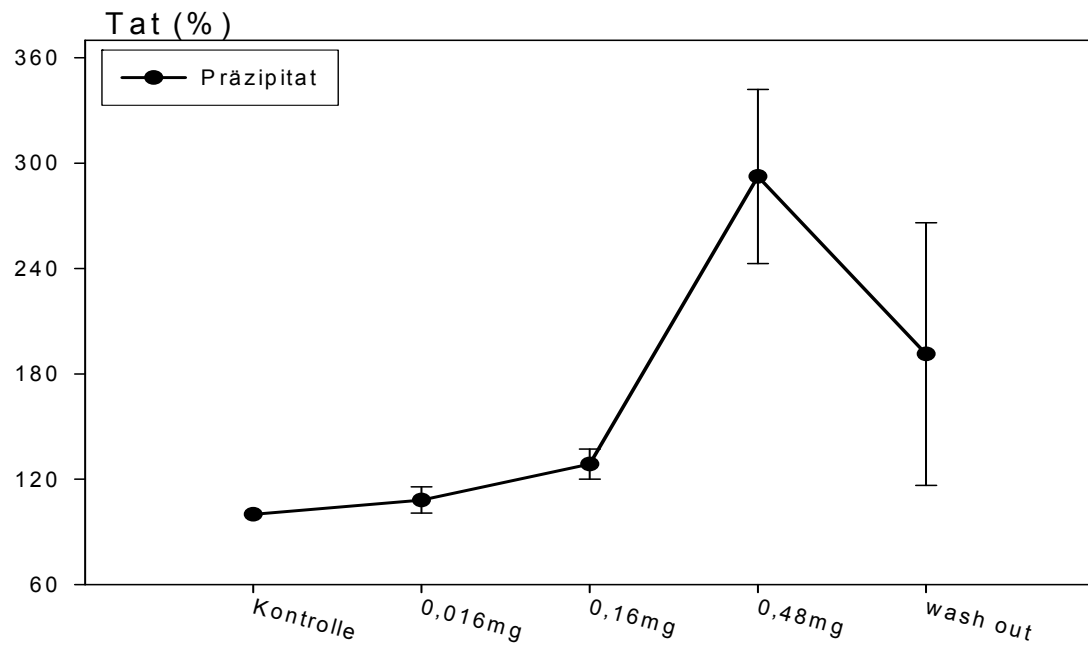


Abb. 13: Darstellung der Auswirkungen des Präzipitats (n = 3) auf die Gesamtaktivierungszeit (TAT) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

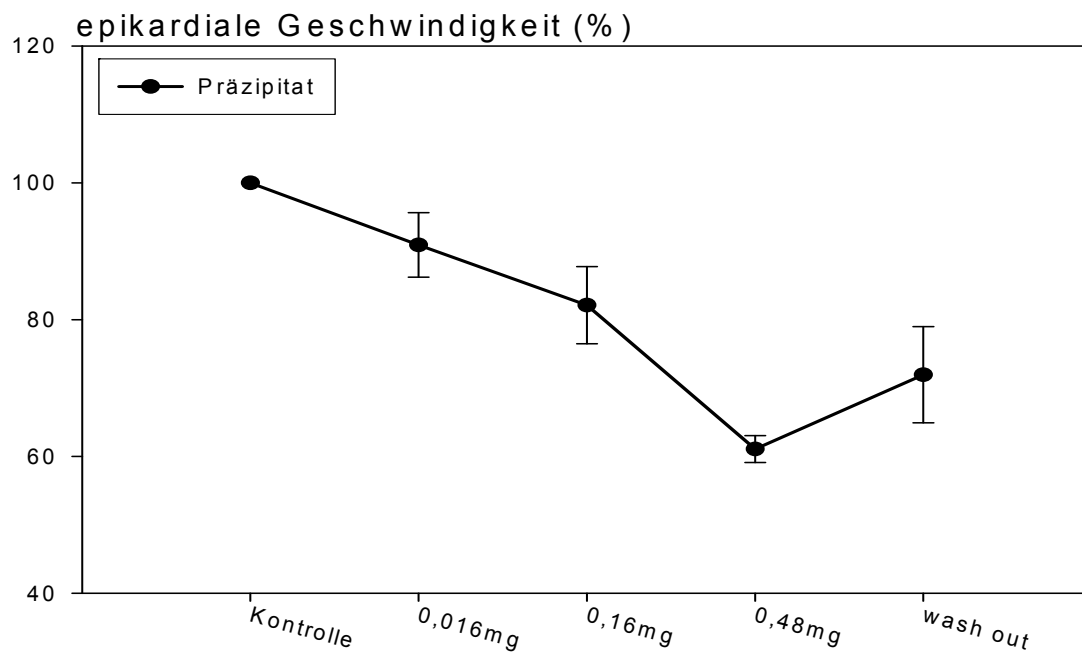


Abb. 14: Darstellung der Auswirkungen des Präzipitats (n = 3) auf die epikardiale Geschwindigkeit (VEL) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %).

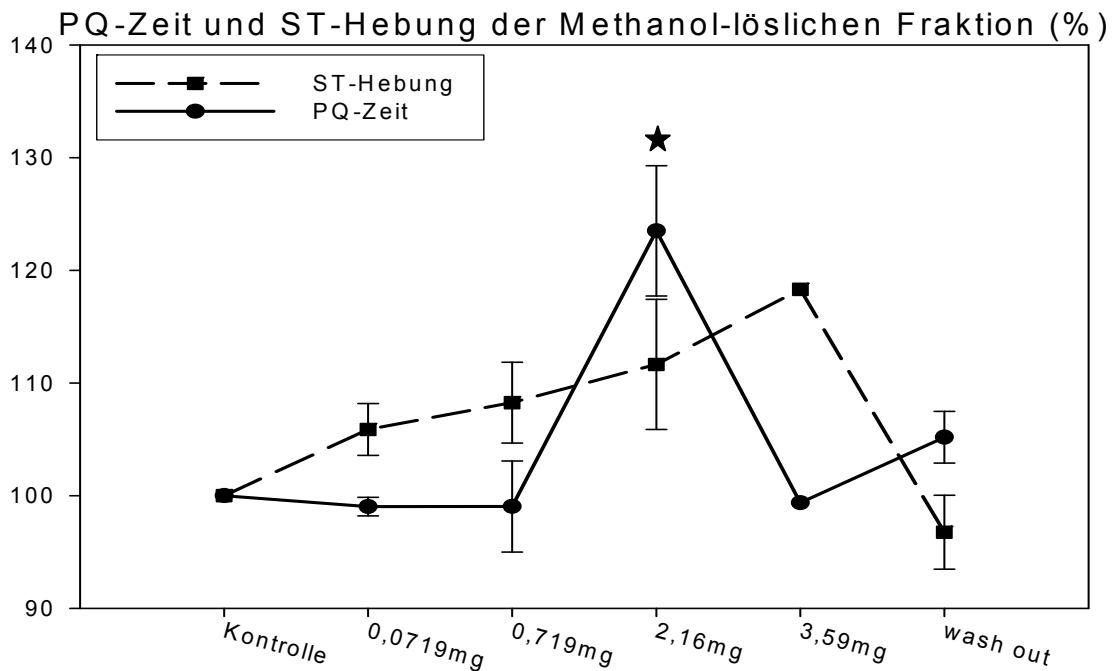


Abb. 15: Darstellung der Veränderungen durch die Methanol-lösliche Fraktion (n = 6) auf die PQ-Zeit und die ST-Hebung im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

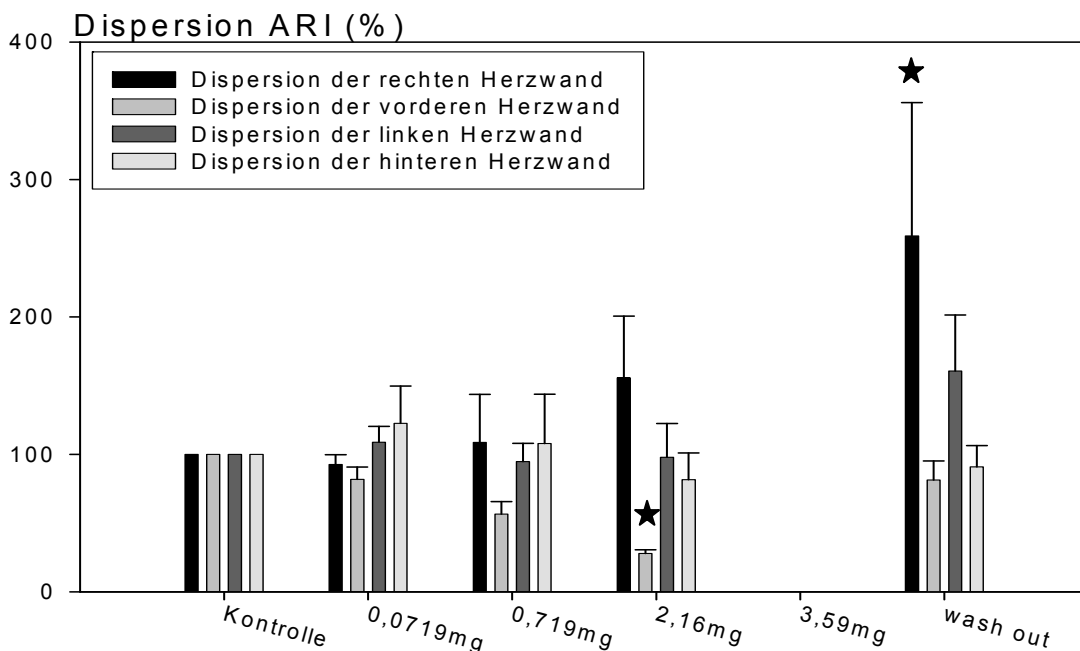


Abb. 16: Darstellung der unterschiedlichen Auswirkungen der Methanol-löslichen Fraktion (n = 6) auf die einzelnen Herzbereiche im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

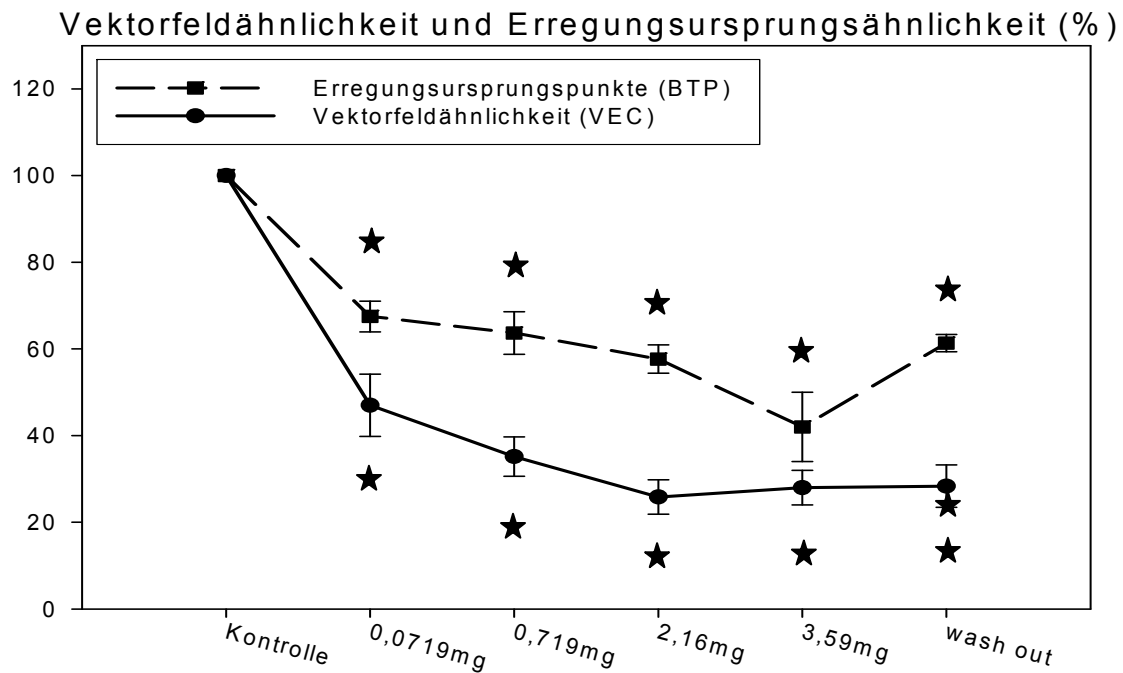


Abb. 17: Darstellung der Auswirkungen der Methanol-löslichen Fraktion (n = 6) auf die Erregungsursprungspunkte (BTP) und die Vektorfelder (VEC) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

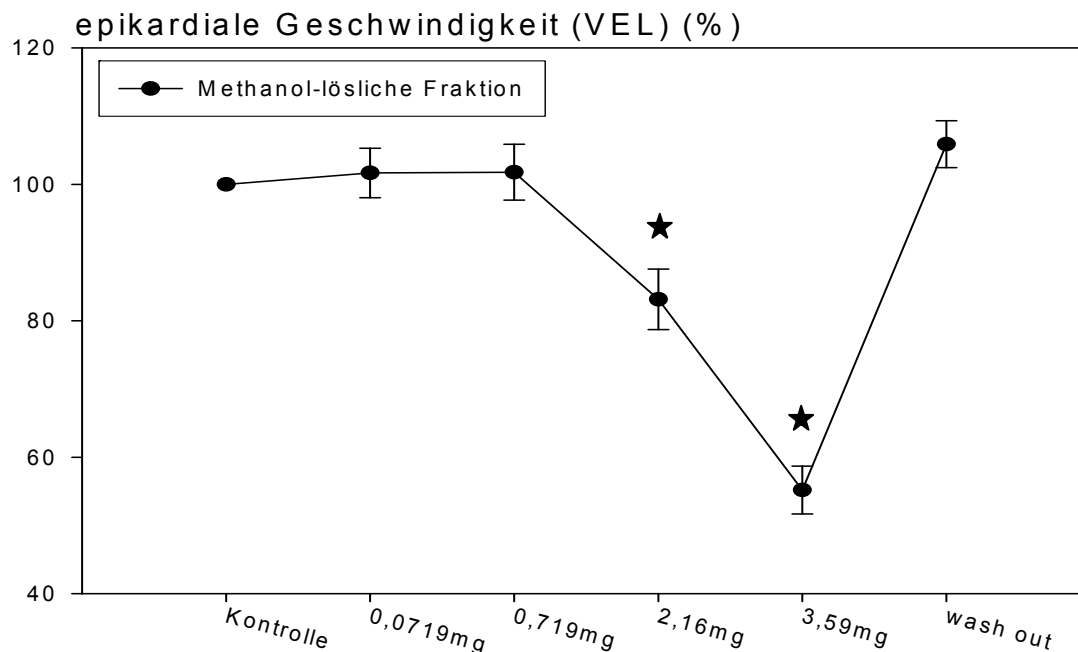


Abb. 18: Der Einfluss der Methanol-löslichen Fraktion (n = 6) auf die epikardiale Geschwindigkeit im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

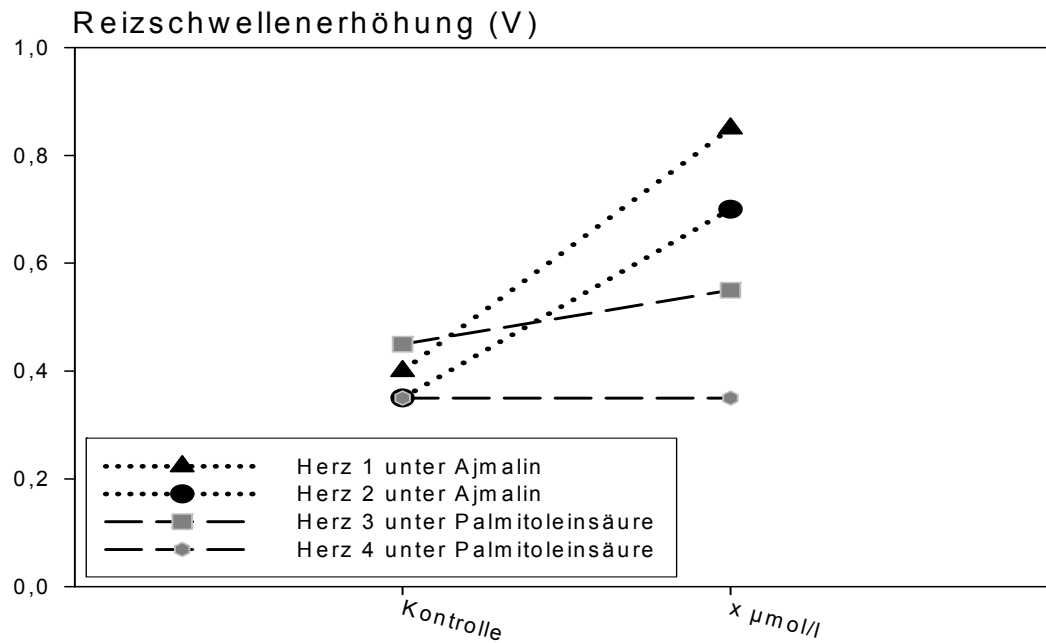


Abb. 19: Repräsentative Darstellung der Auswirkungen von Ajmalin und Palmitoleinsäure auf die Reizschwellen-erhöhung des Herzens ($n = 2$) im Verhältnis zu den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %). X $\mu\text{mol/l}$ entsprechen für Ajmalin 1 mmol/l und für Palmitoleinsäure 10 $\mu\text{mol/l}$.

9.3 ANHANG 3

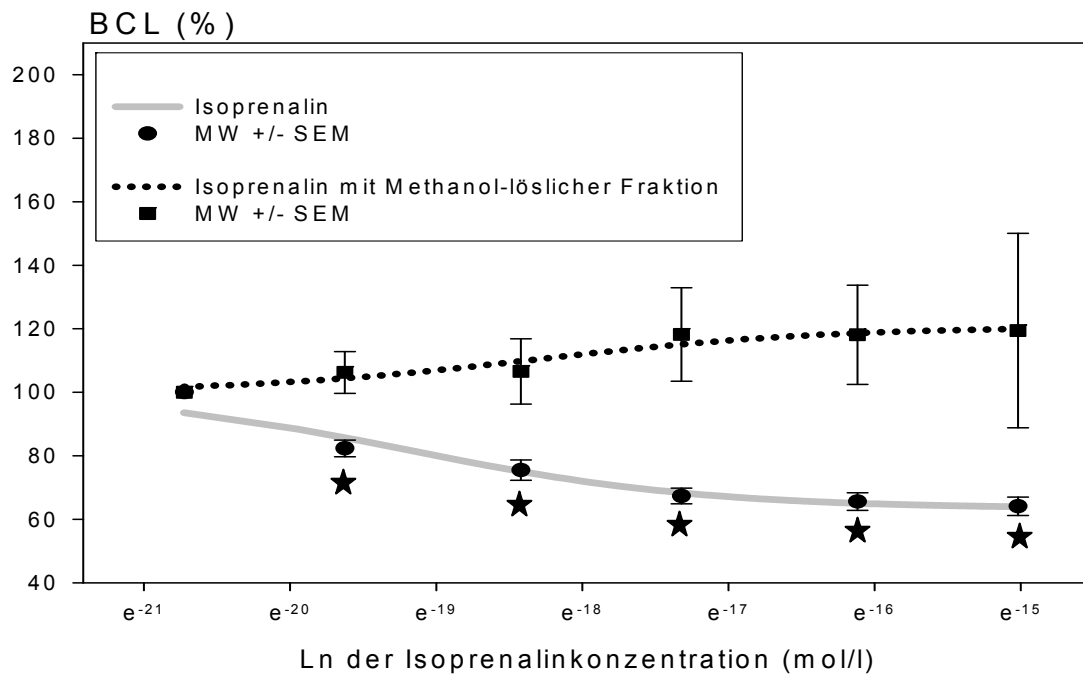


Abb. 1: Darstellung der Veränderungen der basalen Zykluslänge (BCL) unter Isoprenalin und Isoprenalin in Kombination mit der Methanol-löslichen Fraktion (n = 6). Signifikante Werte mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

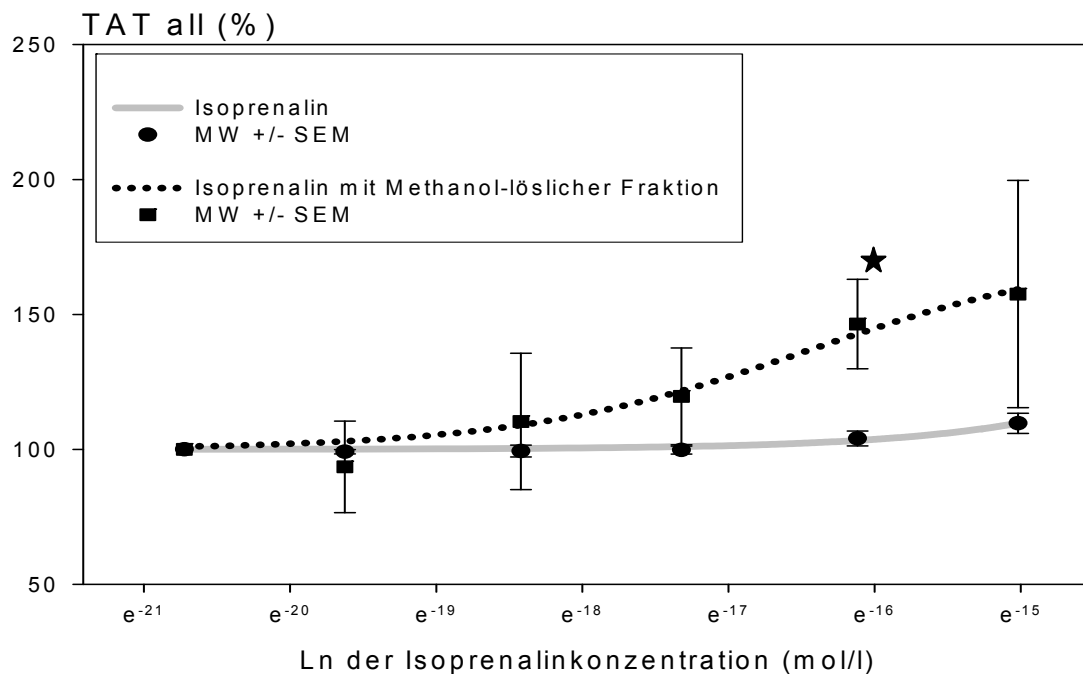


Abb. 2: Vergleich der Gesamtaktivierungszeit (TAT) unter dem Einfluss von Isoprenalin mit der Kombination Isoprenalin + Methanol-löslicher Fraktion (n = 6). Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

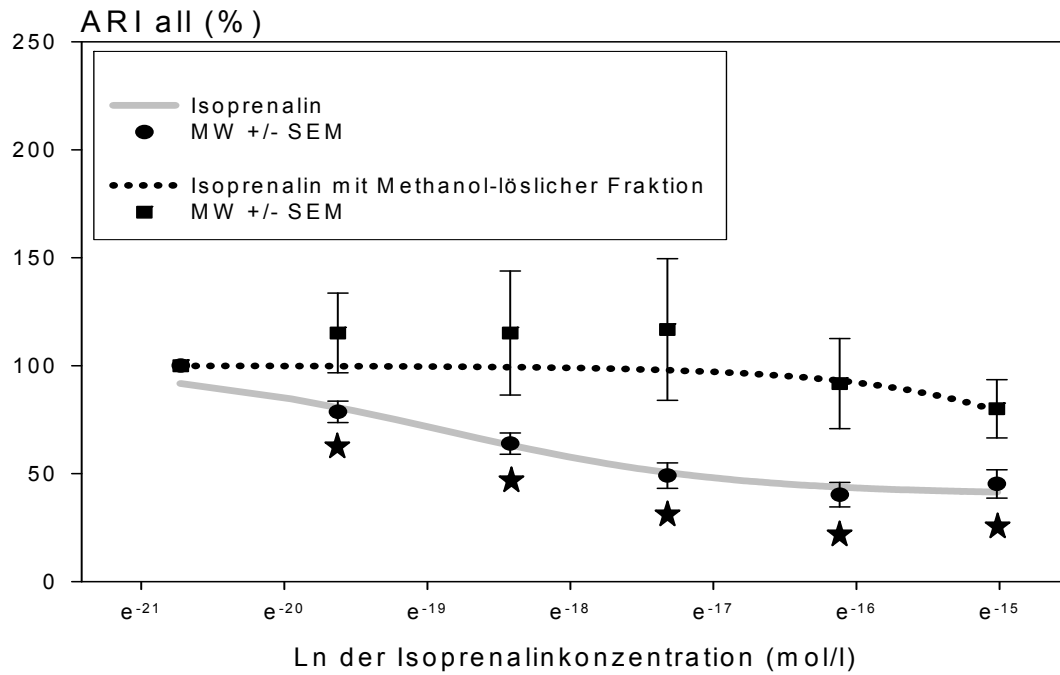


Abb. 3: Vergleichende Darstellung der lokalen Potentialdauer unter Isoprenalin und unter Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion (n = 6). Signifikante Werte mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

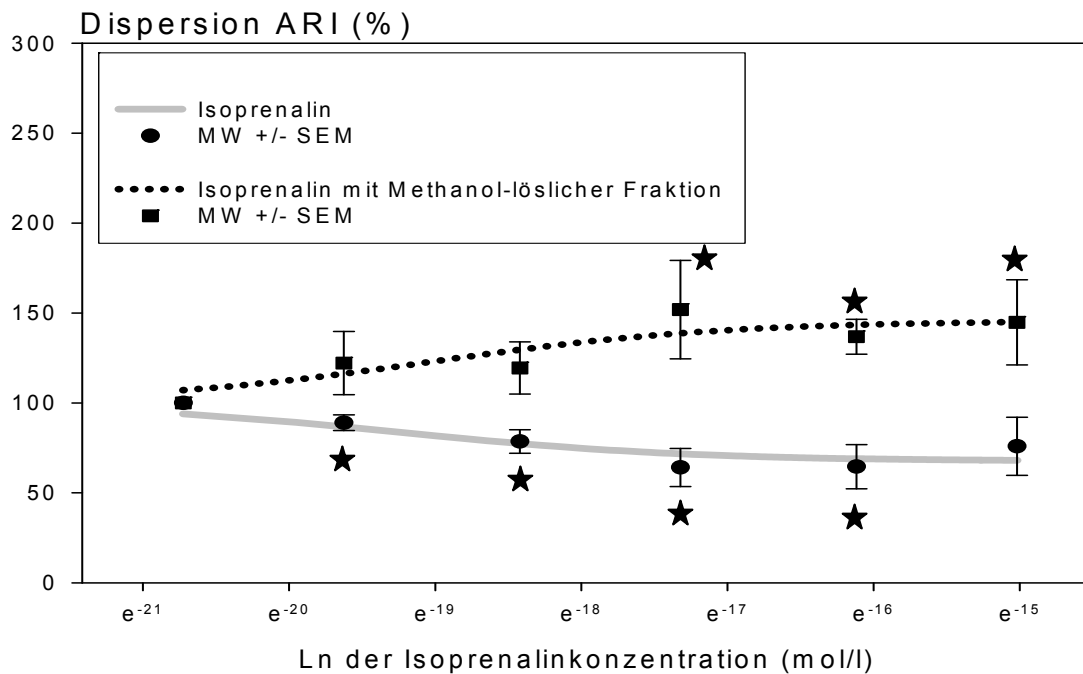


Abb. 4: Unterschiedliche Auswirkungen von Isoprenalin sowie Isoprenalin mit Methanol-löslicher Fraktion (n = 6) auf die Dispersion von ARI. Signifikante Werte mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

9.4 ANHANG 4

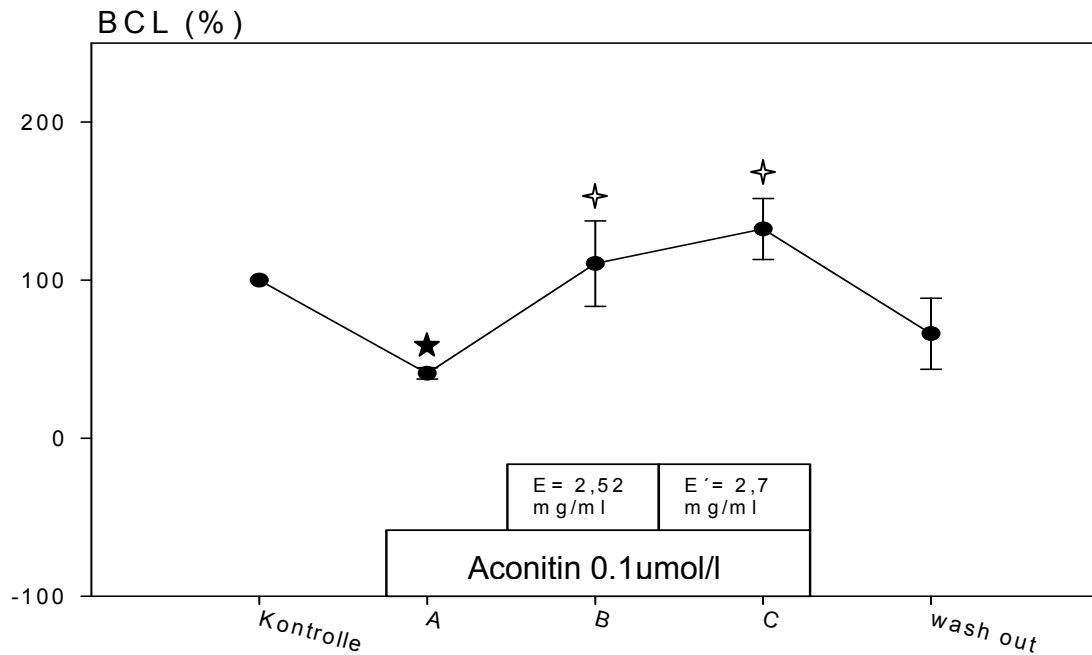


Abb. 1: Veränderung der basalen Zykluslänge (BCL) unter Aconitin und der Gegenbewegung der Methanol-löslichen Fraktion (n = 6). A= Gabe von 0,1 µmol/l Aconitin; B= Applikation von 2,52 mg/ml Methanol-löslicher Fraktion (E) zusätzlich zum Aconitin; C= Applikation von 2,7 mg/ml Methanol-löslicher Fraktion (E') zusätzlich zum Aconitin. Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %) sind mit einem ★ und gegenüber Aconitin-Werten mit einem ✧ gekennzeichnet.

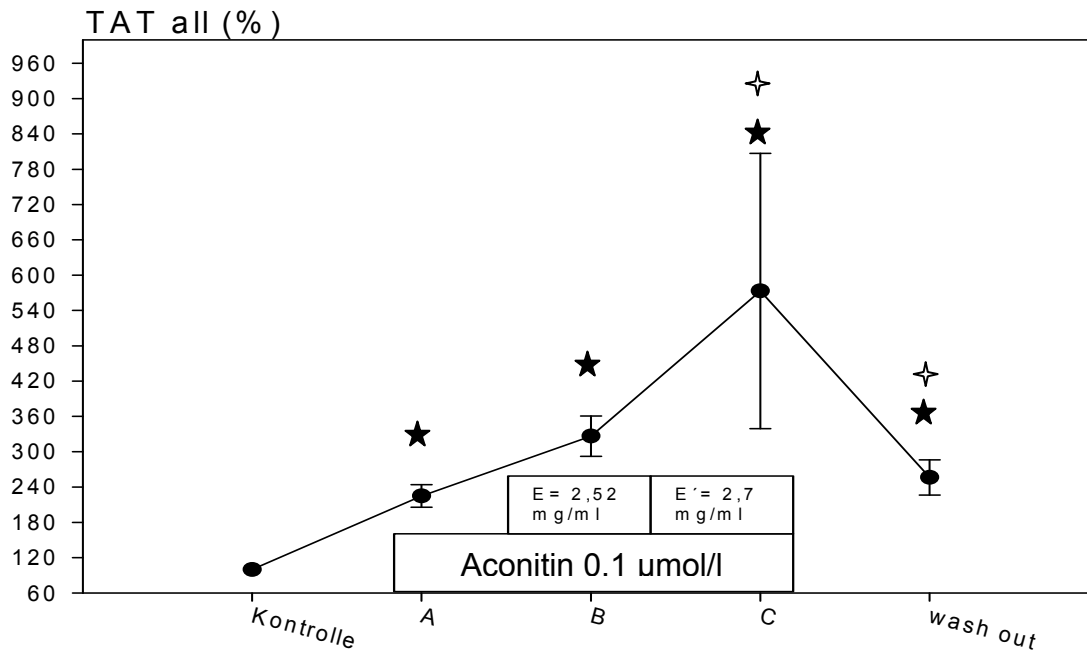


Abb. 2: Darstellung der Gesamtaktivierungszeit und die Veränderungen durch Aconitin und durch den Methanol-löslichen Extrakt. A= Infusion von 0,1 µmol/l Aconitin ; B= zusätzliche Applikation von 2,52 mg/ml Methanol-löslichen Extrakts (E); C= Applikation von 2,7 mg/ml Methanol-löslichen Extrakt (E') zum Aconitin. Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen (Kontrolle = 100 %) sind mit einem ★ gekennzeichnet und gegenüber Aconitin-Werten mit einem ✧ gekennzeichnet.

9.5 ANHANG 5

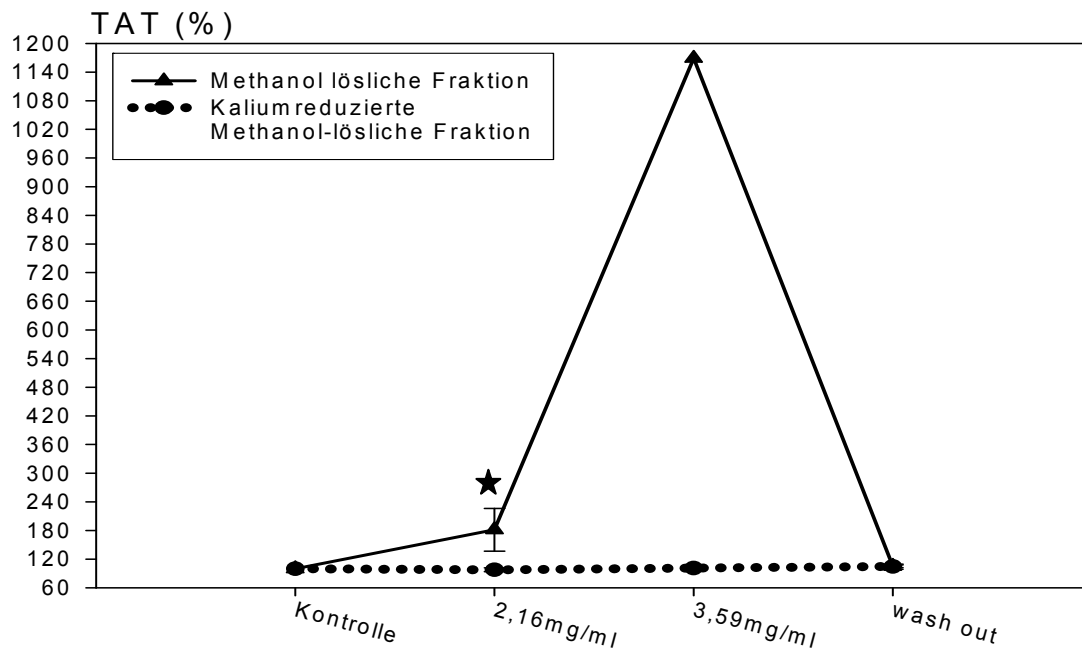


Abb. 1: Vergleichende Darstellung der Auswirkungen auf die Gesamtaktivierungszeit durch die Kalium-reduzierte Fraktion (n = 3) und die Methanol-lösliche Fraktion (n = 6). Signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$ gegenüber den Kontrollbedingungen sind mit einem ★ gekennzeichnet.

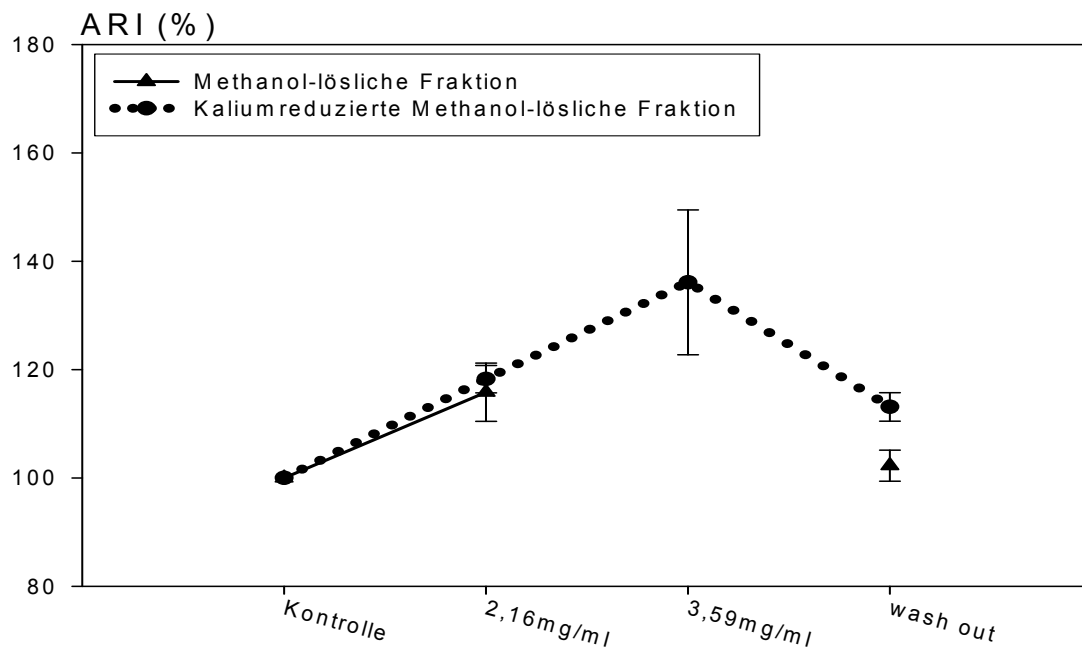


Abb. 2: Anstieg der lokalen Potentialdauer unter der Methanol-löslichen Fraktion (n=6) und der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion (n = 3). Da unter der Methanol-löslichen Fraktion bei 3,59 mg/ml ein Herzstillstand erzeugt wurde (s. 4.1.7.2), konnte für diese Konzentration kein Wert erstellt werden.

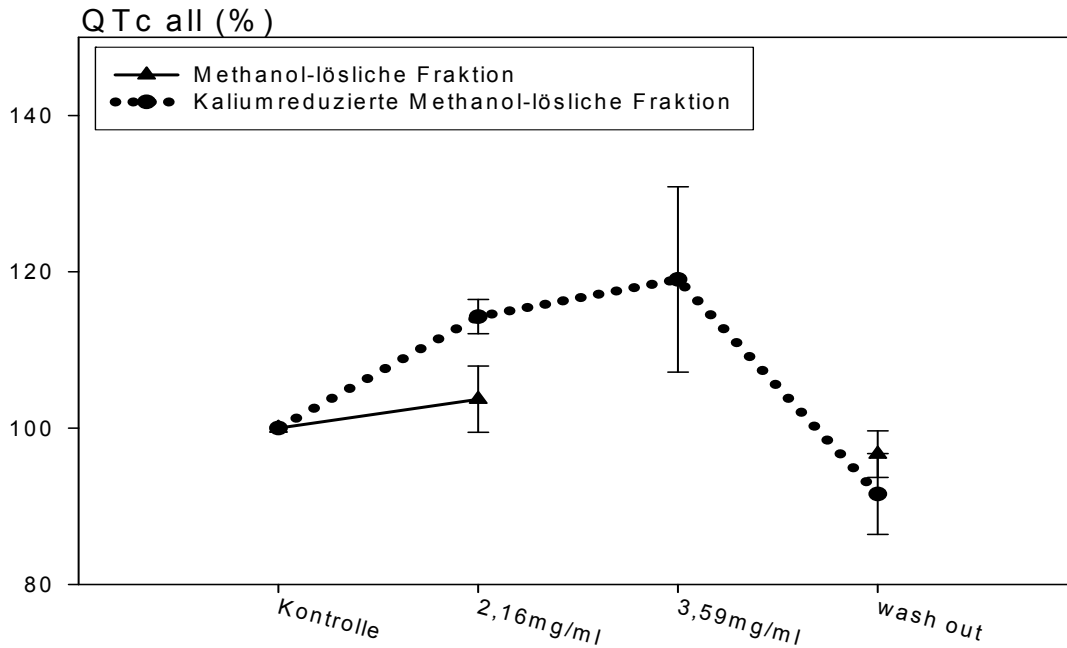


Abb. 3: Vergleich der Veränderung der Frequenz-normalisierten, lokalen Potentialdauer unter dem Einfluss der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion (n = 3) und der Methanol-löslichen Fraktion (n = 6). Da unter der Methanol-löslichen Fraktion bei 3,59 mg/ml ein Herzstillstand erzeugt wurde (s. 4.1.7.2), konnte für diese Konzentration kein Wert erstellt werden.

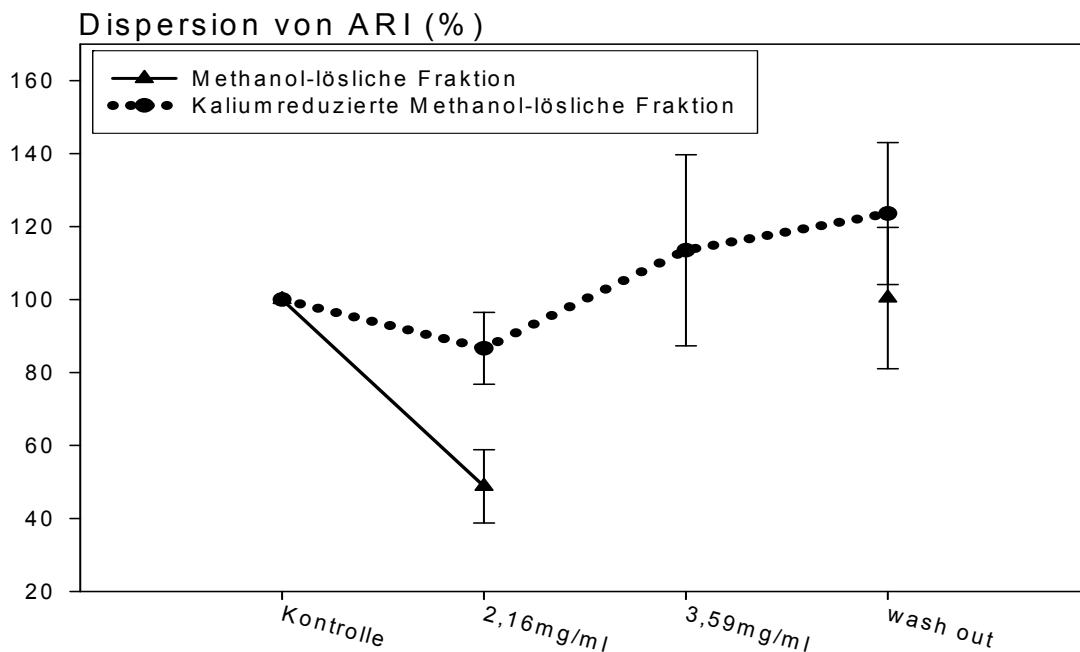


Abb. 4: Unterschiedlicher Dispersionsabfall durch die Methanol-lösliche Fraktion (n=6) und die Kalium-reduzierte Methanol-lösliche Fraktion (n = 3) . Da unter der Methanol-löslichen Fraktion bei 3,59 mg/ml ein Herzstillstand erzeugt wurde (s. 4.1.7.2), konnte für diese Konzentration kein Wert erstellt werden.

9.6

ANHANG 6

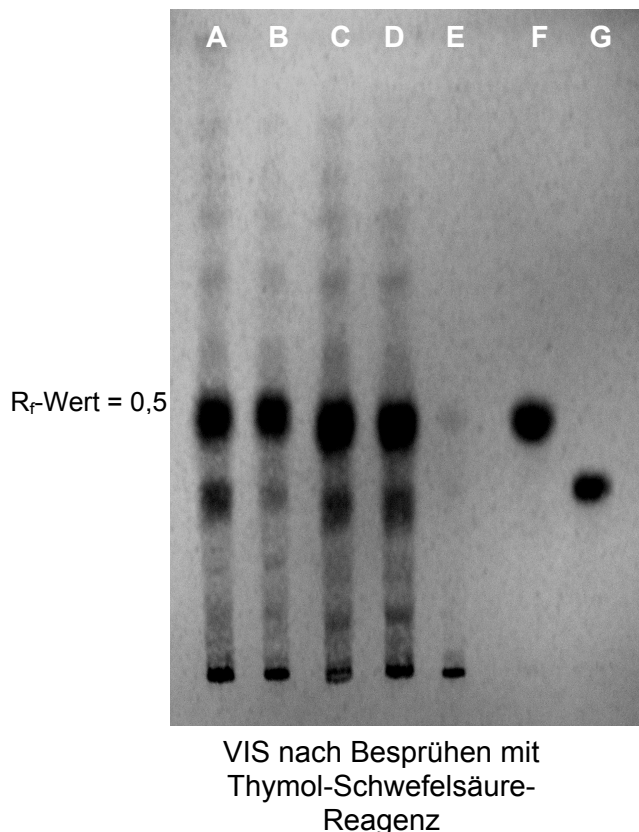


Abb. 1:

DC-Nachweis von Sacchariden im
Soxhlet-Extrakt und dessen wässriger
Fraktionen im Vergleich zu Glukose
und Saccharose im Tageslicht nach
Detektion mit Thymol-Schwefelsäure-
Reagenz (s. 3.7).

A = Soxhlet-Extrakt

B = wässrige Fraktion

C = Methanol-löslicher Extrakt

D = Kalium-reduzierte Methanol-
lösliche Fraktion

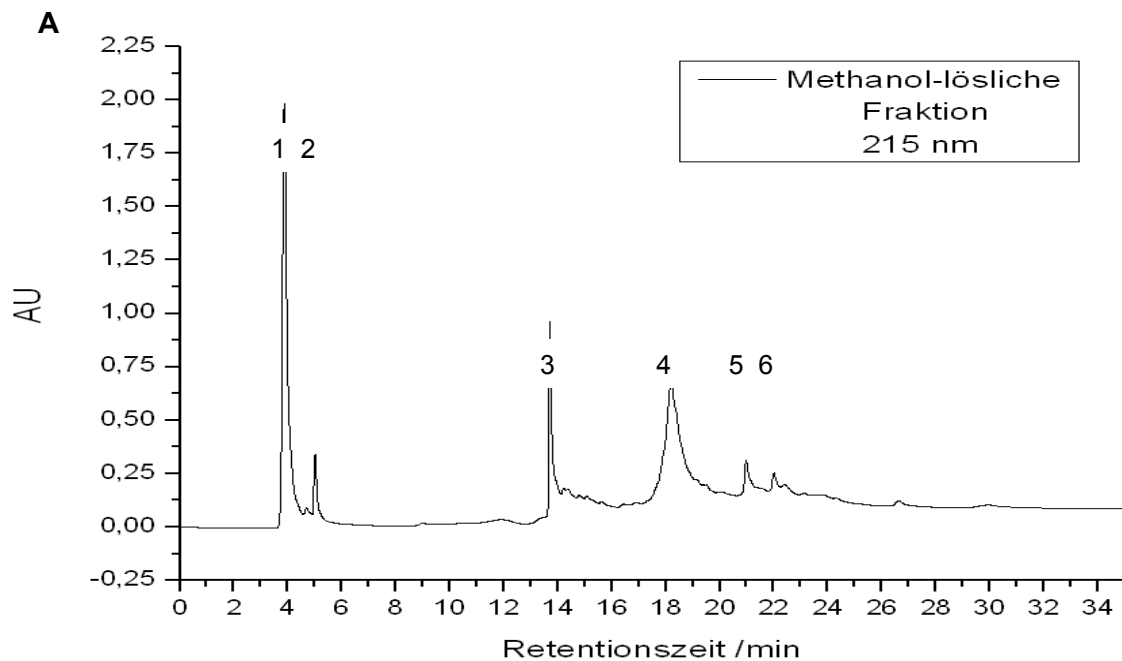
E = Methanol-Präzipitat

F = Glukose

G = Saccharose

Fließmittel: (65 : 25 : 10)

Ethylazetat:Methanol:Wasser



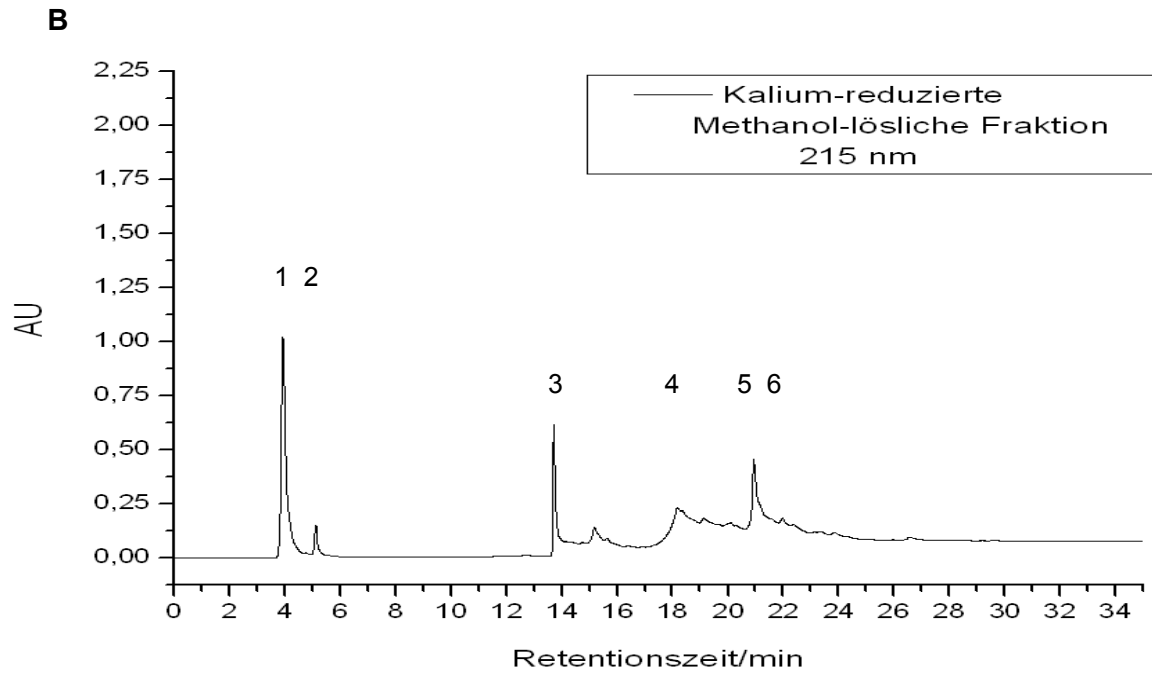
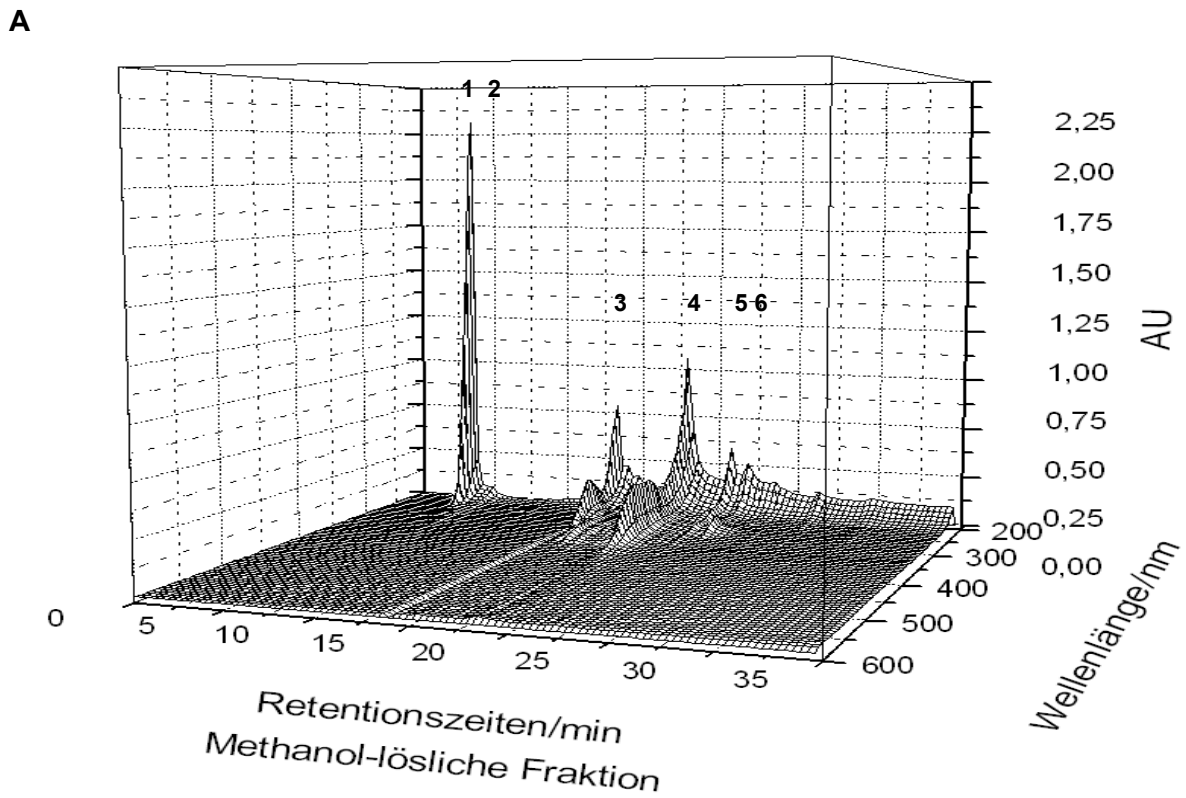
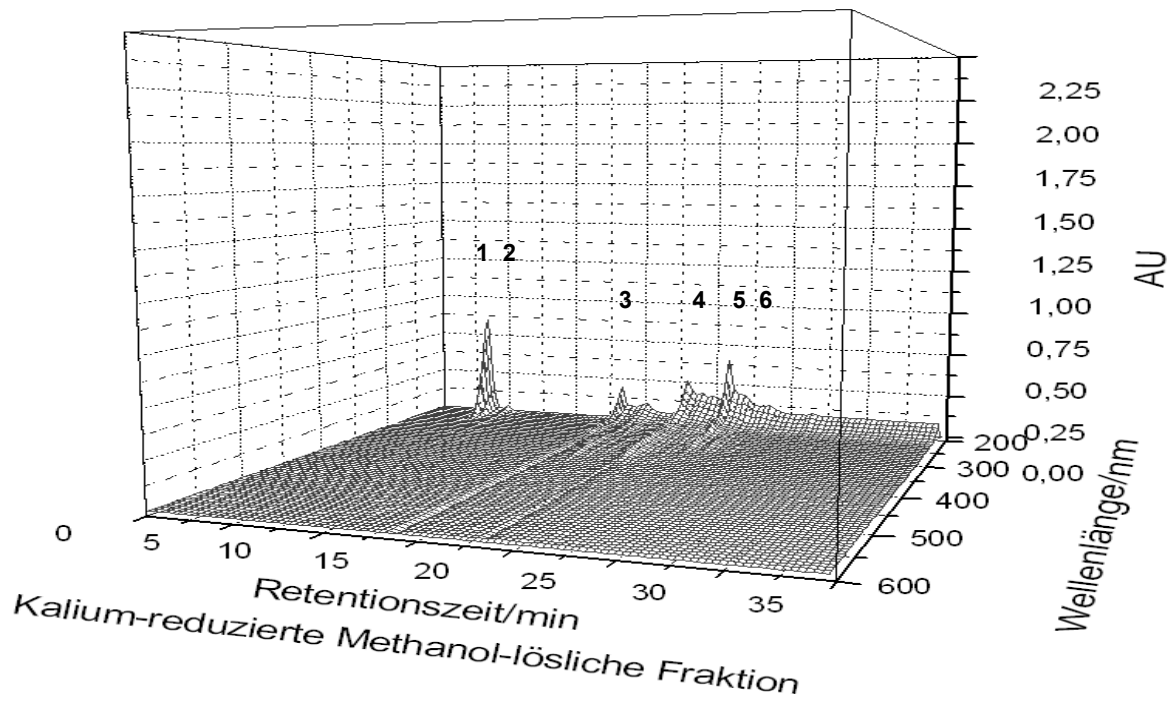


Abb. 2: HPLC-Fingerprint (s. 3.8) der Methanol-löslichen Fraktion im Bereich von 215 nm (A); HPLC-Fingerprint der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion im Bereich von 215 nm (B).



B



C

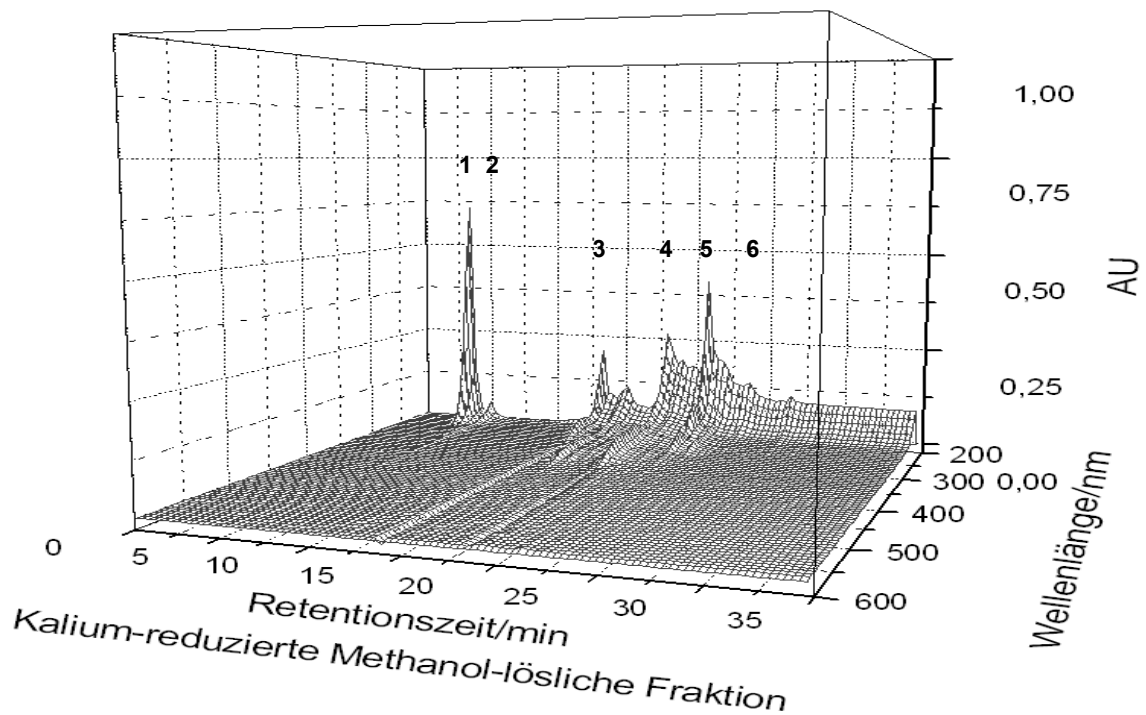


Abb. 3: 3D-Darstellung des HPLC-Fingerprints der Methanol-löslichen Fraktion im Bereich von 200 – 600 nm (A); Fingerprint in 3D-Darstellung der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion im Bereich von 200 – 600 nm (B); Darstellung der Kalium-reduzierten Methanol-löslichen Fraktion in 3D bei veränderter y-Achse (C).

10 DANKSAGUNG

Allen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle danken.

Als erstes gebührt der Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. F.R. Ungemach, der mir immer wieder neuen Anstoß gab und viele Fortschritte im Laufe des Promotionsprozesses anregte.

Meinem Betreuer Prof. Dr. S. Dhein danke ich für die intensiven Diskussionen und praktische Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und -auswertung in Zusammenhang mit meiner Arbeit, die mir halfen, viele Fragen zu klären und deutlicher zu sehen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. J. Rauwald für seine unermüdliche Unterstützung bei der Extrakterstellung und – fraktionierung sowie für die Möglichkeit, in seinen Laboratorien arbeiten zu dürfen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern dort danken, insbesondere bei Frau Dr. Ch. Grötzinger.

Der H. Wilhelm-Schaumann-Stiftung danke ich für die finanzielle Förderung, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Familie und meinem Freund Matthias Hinken möchte ich für die liebevolle Unterstützung in Krisenzeiten und in guten Zeiten danken.

Meiner Freundin und Kollegin Britta ThenBergh möchte ich für das mühevollen Korrekturlesen danken.